

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



Nuevos tratamientos en un modelo animal de la enfermedad de Lafora

Gentzane Sánchez Elexpuru
Madrid, 2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Nuevos tratamientos en un modelo animal de la enfermedad de Lafora

Memoria de investigación presentada por

Gentzane Sánchez Elexpuru
Licenciada en Biología

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por:

Dr. Marina P. Sánchez García
Investigadora del IIS-Fundación Jiménez Díaz

Y

Dr. José M. Serratosa Fernández
Jefe del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Fundación
Jiménez Díaz

Trabajo realizado en el laboratorio de Neurología del IIS-Fundación Jiménez Díaz, con una Beca de la Fundación Conchita Rábago.



Madrid, 7 de Marzo de 2017

Marina P. Sánchez García, Investigadora del IIS-Fundación Jiménez Díaz y
José M. Serratosa Fernández, Jefe del Servicio de Neurología del Hospital
Universitario Fundación Jiménez Díaz

INFORMAN

Que la presente tesis doctoral titulada “Nuevos tratamientos en un modelo animal de la enfermedad de Lafora” ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Gentzane Sánchez Elexpuru.

Los directores de la tesis,

Dr. Marina P. Sánchez García

José M. Serratosa Fernández

*Nire Amatxu, Aitatxu eta
Saiotxurentzat*

AGRADECIMIENTOS

Más de cuatro años de trabajo llenos de aprendizaje, de superación, de ilusión y de nervios. Más de cuatro años rodeada de mucha gente que, cada uno a su manera, me han enseñado, guiado y apoyado, y que han hecho de estos años una etapa inolvidable.

Quisiera comenzar por dar las gracias a mis directores de tesis, a la Dra. Marina Sánchez y al Dr. Jose M. Serratosa, por enseñarme y guiarme durante estos años, por darme la oportunidad y por confiar en mí. Gracias Marina por estar siempre presente y por todo lo que hemos compartido. Gracias Jose por tus consejos y todo tu apoyo.

A la Fundación Conchita Rábago, su apoyo a los jóvenes en nuestras primeras etapas en el mundo de la investigación es muy importante, me han dado una oportunidad por la que siempre estaré agradecida. En especial gracias a Marta Jiménez, por tu cercanía y cariño, por estar siempre pendiente y disponible.

Al servicio de Cirugía y Experimentación animal. Al Dr. Carlos Castilla por su ayuda y apoyo, a Carlos, por las largas horas compartidas, a Pilar y Juani, por cuidar de mis ratoncillos, y a Irene y Diego, por estar siempre dispuestos a ayudar.

Al servicio de Anatomía patológica, por la ayuda proporcionada con la tinción de PAS y por las muestras de cerebro humano, en especial al Dr. Fortes y a Belén. También gracias al Dr. Rábano por las muestras proporcionadas.

Al Dr. Enrique Lara y todo su grupo del CNIC, por toda la ayuda en nuestra colaboración. Pero sobre todo muchas gracias a María Villalba, ha sido una experiencia buenísima trabajar contigo, no sólo por todo lo que he aprendido, si no por tu entusiasmo y como me lo has transmitido.

A Rosa, por todo: por tus consejos, tu apoyo, tu cariño, las largas horas de conversaciones de ciencia y de la vida, por los abrazos y las sonrisas y por todos los momentos que hemos vivido juntas.

Gracias a todos y cada uno de los que habéis estado en el laboratorio. Gracias Gema por tu complicidad, por cuidarme y porque me has alegrado los días y Laura, mi gran compañera en esta etapa, porque juntas hemos compartido mucho. A Anita, porque sin conocerme no dudaste en ayudarme siempre que lo necesité. A Asun, por tu sonrisa, apoyo y nuestros grandes momentos de baile, por ser la reina de la fiesta. A Bea, por tu cariño y porque siempre aportas otra visión a las cosas, y a Víctor, por tu alegría. A Irene, porque derrochas entusiasmo, ganas de aprender y de ayudar, y porque juntas compartimos una etapa inolvidable. A Max, Cris y Sara por haber traído aire fresco y alegría cuando menos me lo esperaba. Gracias Max por aportarme calma y por todo lo que nos hemos reído, a Cris por tu sonrisa y por toda tu ayuda y a Sara, nuestra organizadora de eventos particular, porque eres una gran persona. A Estrella, por tu cariño y tus consejos y a Pedro, por tus alegres visitas.

Gracias a los que cada día habéis estado conmigo, compartiendo comidas, cafés, descansos, y por supuesto, consejos. A Nieves, porque siempre tienes tiempo para unas palabras de calma en los momentos de nervios y para un buen consejo. A Zaida, por todo lo que nos hemos reído. A Olaya, por tu complicidad y apoyo, porque sé que siempre podré contar contigo, estoy segura de que te espera un gran camino. A David, que tantas horas nos ha aguantado y tantas sonrisas nos ha sacado. A Elisa, por tu alegría, cariño y sinceridad y a Pilar, por el tiempo compartido. A Carmen Garcés, gracias por tu cariño y tu apoyo. A Jonay y Sandra, a los que en tantas ocasiones he acudido en busca de consejo, y quienes siempre se han volcado en ayudarme. A Tarín, por su ayuda y compañía en las largas horas en el animalario. Y en general a toda la gente de los laboratorios, por la buena armonía y la constante ayuda.

Y por supuesto gracias a todos mis amigos, con los que he vivido esta gran etapa. A Teresa, un gran pilar en mi vida, que me ha dado la energía y serenidad para seguir adelante en todo, siempre presente ante cualquier cosa. A Anna y Kelsey, con quienes tantas horas he compartido. A Verónica, por apoyarme desde el principio y hasta el final. A Rafa y Marina, porque me habéis hecho sentir como en familia. A Sarah, porque vivimos muy buenos momentos y por toda tu ayuda con el inglés. A mis profesores, compañeros y amigos de inglés, siempre pendientes de los avances en mi tesis.

A Ianire y Oiane, porque sois inigualables, imprescindibles, insustituibles, siempre presentes, siempre apoyándome y siempre preparadas para sacar la mejor de mis sonrisas. Y por supuesto a Koke, por aportar calma en cada situación.

Gracias de todo corazón a mi familia. Desde el primero hasta el último, siempre apoyándome en cada paso, especialmente a Amama Feli, Aitite Paco y, sobre todo, a Amama Ursi, porque sin comprender bien lo que hago siempre se han sentido orgullosos y me han empujado a seguir adelante.

*Pero, sobre todo, infinitas gracias a mi hermana, **Saioa**, y a mis padres, **Susana y Patxi**. Gracias a ellos soy como soy, y gracias a ellos he conseguido finalizar esta etapa. Por ello, quiero dedicarles esta tesis. Gracias Saiotxu, nunca has dudado de que podría conseguir lo que me propusiera, siempre has conseguido transmitírmelo y me has hecho sentir tu apoyo, has estado ahí siempre, para lo bueno y para lo malo, para reír y para llorar. Gracias Amatxu y Aitatxu, por vuestro eterno apoyo y confianza, por darme siempre la libertad de decidir mi camino y vivirlo intensamente conmigo en cada momento.*

Porque cada uno de vosotros habéis puesto vuestro granito de arena en este camino, y porque sin vosotros esto no hubiera sido lo mismo, ¡MUCHISIMAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	13
SUMMARY	17
INTRODUCCIÓN.....	21
1. SÍNTOMAS CLÍNICOS	23
2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	24
3. GENES Y PROTEÍNAS	25
4. MODELOS ANIMALES.....	28
5. METABOLISMO DE GLUCÓGENO	30
6. PROTEOSTASIS Y ESTRÉS OXIDATIVO	32
7. SENSIBILIDAD A PENTILENOTETRAZOL (PTZ)	35
8. NUEVOS TRATAMIENTOS EN MODELOS ANIMALES	35
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	45
1.1. Ratones Epm2a ^{-/-}	45
1.2. Ratones Epm2b ^{-/-}	45
1.3. Ratones control	45
1.4. Mantenimiento de los animales.....	45
1.5. Genotipado.....	46
2. TRATAMIENTOS	46
2.1. Tratamiento con 4-PBA	46
2.2. Tratamiento con metformina.....	47
2.3. Tratamiento con selenato sódico.....	47

3. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO MOTOR	47
3.1. Análisis de la actividad motora en el actímetro.....	48
3.2. Experimentos de coordinación motora y equilibrio en el rotarod	48
3.3. Estudios de las alteraciones de postura y discinesias mediante el test de suspensión de la cola	48
4. ESTUDIOS DE MEMORIA MEDIANTE EL TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS.....	49
5. ANÁLISIS DE VÍDEO-EEG	49
5.1. Elaboración de los electrodos	50
5.2. Implantación de los electrodos intracraneales en ratones.....	50
5.3. Registro de vídeo-EEG	51
5.4. Administración de PTZ	51
6. ECOCARDIOGRAFÍA	52
7. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS	52
7.1. Disección y preparación de las muestras.....	52
7.2. Fijación e inclusión en parafina.....	53
7.3. Cortes histológicos	54
7.4. Tinción del ácido periódico de Schiff, PAS	54
7.5. Inmunohistoquímica	54
7.6. Microscopia óptica	55
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS	57
1. ESTUDIOS DE EXCITABILIDAD NEURONAL MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE PTZ EN LOS MODELOS EPM2A^{-/-} Y EPM2B^{-/-} DE LA ENFERMEDAD DE LAFORA.....	59
1.1. Patrón de crisis inducidas por PTZ en ratones de 16 meses.....	59
1.2. Sensibilidad de estos modelos a la administración de PTZ en edades tempranas	61
2. ENSAYOS DE NUEVOS AGENTES FARMACOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE LAFORA.....	62
2.1. Tratamiento con 4-PBA	62
2.2. Tratamiento con metformina.....	64
2.3. Tratamientos con selenato sódico	66
3. ESTUDIO DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DEL SELENATO SÓDICO	80

3.1. Evaluación de la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro de los modelos Epm2a ^{-/-} y Epm2b ^{-/-}	80
4. ESTUDIOS DEL MIOCARDIO EN LOS MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE LAFORA	81
4.1. Estudios de ecocardiografía	82
4.2. Análisis de la masa cardíaca	84
4.3. Análisis histológicos del miocardio	85
DISCUSIÓN	87
1. HIPEREXCITABILIDAD EN RESPUESTA A PTZ DE LOS MODELOS ANIMALES DE LAFORA	89
2. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON 4-PBA Y METFORMINA SOBRE EL FENOTIPO EPILÉPTICO DEL MODELO EPM2B ^{-/-}	90
3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SELENATO SÓDICO SOBRE LOS SÍNTOMAS Y LA HIPEREXCITABILIDAD EN EL MODELO EPM2B ^{-/-}	93
4. RELACIÓN DEL TRATAMIENTO CON SELENATO SÓDICO Y LA PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA ...	95
5. ALTERACIONES CARDÍACAS DE LOS MODELOS ANIMALES DE LAFORA	96
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXO	115

ABREVIATURAS

4-PBA	(<i>4-phenylbutyrate o 4-phenylbutyric acid</i>) ácido 4-fenilbutírico
AMPK	(<i>AMP-activated protein kinase</i>) proteína quinasa activada por AMP
BIP/Grp78	(<i>binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78</i>) proteína de unión a inmunoglobulina/proteína 78 regulada por glucosa
CA1	(<i>cornus ammonis 1</i>) asta de Ammon 1
CBD	(<i>carbohydrate binding domain</i>) dominio de unión a carbohidratos
Cho	colina
Cr	creatinina
CuZnSOD	superóxido dismutasa citosólica
DAB	diaminobenzidina
DSP	(<i>dual specificity phosphatase</i>) fosfatasa de especificidad doble
EEG	electroencefalograma
EPM2A	(<i>epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A</i>) gen A de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
<i>Epm2a</i> ^{-/-}	ratón nulo para la expresión de laforina
EPM2AIP1	(<i>EPM2A interacting protein 1</i>) proteína 1 de interacción con EPM2A
EPM2B	(<i>epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene B</i>) gen B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
<i>Epm2b</i> ^{-/-}	ratón nulo para la expresión de malina
ER	(<i>endoplasmatic reticulum</i>) retículo endoplasmático
FC	frecuencia cardíaca
G6P	(<i>glucose-6-phosphate</i>) glucosa-6 fosfato
GABA _A	(<i>gamma-aminobutyric acid type A</i>) receptor del ácido γ-aminobutírico tipo A
GFAP	(<i>glial fibrillary acidic protein</i>) proteína gliofibrilar ácida

GP	(<i>glycogen phosphorylase</i>) glucógeno fosforilasa
GS	(<i>glycogen synthase</i>) glucógeno sintasa
GSK3	(<i>glycogen synthase kinase 3</i>) glucógeno sintasa quinasa 3
HIRIP5	(<i>HIRA-interacting protein 5</i>) proteína 5 de interacción con HIRA
ID	índice de discriminación
i.p.	intraperitoneal
LVAWd	(<i>left ventricle anterior wall in diastole</i>) pared anterior del ventrículo izquierdo en diástole
LVPWd	(<i>left ventricle posterior wall in diastole</i>) pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole
MGS	(<i>muscle glycogen synthase</i>) glucógeno sintasa de músculo
MnSOD	superóxido dismutasa mitocondrial
mTOR	(<i>mammalian target of rapamycin kinase</i>) diana de rapamicina en células de mamífero
Myo	mioinositol
NAA	N-acetil aspartato
NeuN	(<i>neuronal nuclei</i>) núcleos neuronales
NFTs	(<i>neurofibrillary tangles, NFTs</i>) ovillos neurofibrilares
NHLRC1	(<i>NHL repeat-containing protein 1</i>) proteína 1 con repetición NHL
ORT	(<i>object recognition task</i>) test de reconocimiento de objetos
PAS	(<i>periodic acid-Schiff</i>) ácido periódico de Schiff
PP1	(<i>protein phosphatase 1</i>) proteína fosfatasa 1
PP2A	(<i>protein phosphatase 2 A</i>) proteína fosfatasa 2 A
PRX6	peroxirredoxina-6
PTZ	pentilenotetrazol

R5/PTG	(<i>protein targeting to glycogen</i>) proteína de orientación a glucógeno
RING	(<i>really interesting new group of proteins</i>) nuevo grupo de proteínas muy interesantes
ROS	(<i>reactive oxygen species</i>) especies reactivas de oxígeno
SEM	(<i>standard error of the mean</i>) error estándar de la media
TRX1	tiorredoxina 1
TST	(<i>tail suspension test</i>) test de suspensión de la cola
ULK1	(<i>unc-51 Like autophagy activating kinase 1</i>) quinasa 1 tipo unc-51 activadora de autofagia
VDAC1	(<i>voltage dependent anion channel 1</i>) canal dependiente de voltaje 1
VDAC2	(<i>voltage dependent anion channel 2</i>) canal dependiente de voltaje 2

RESUMEN

La enfermedad de Lafora es una epilepsia mioclónica progresiva causada por mutaciones en el gen EPM2A, que codifica la proteína laforina, o en el gen EPM2B, que codifica la proteína malina. La principal característica de esta enfermedad es la presencia de agregados similares al glucógeno en el cerebro y otros órganos, que se denominan cuerpos de Lafora. Los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} muestran muchas de las alteraciones que se observan en pacientes y representan una buena herramienta para la búsqueda de tratamientos. Se ha descrito una mayor sensibilidad de estos ratones al agente epileptógeno PTZ. Además, en este trabajo se ha observado que las crisis de estos modelos en respuesta a PTZ presentan un patrón específico diferente a los ratones control, y que la mayor sensibilidad a PTZ de estos ratones no ocurre en edades tempranas. Los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} también muestran alteraciones en el metabolismo de glucógeno, en la eliminación de proteínas anómalas (p. ej., la autofagia) y presentan, además, estrés oxidativo. En este trabajo se han realizado tratamientos en ratones *Epm2b*^{-/-} con 4-PBA, una chaperona química que revierte el mal-plegamiento de proteínas, y con metformina, un fármaco que activa a la AMPK. Además de los beneficios previamente descritos, estos tratamientos también producen una disminución de la hipersensibilidad a PTZ. También se han tratado ratones *Epm2b*^{-/-} con selenato sódico, un compuesto que posee una alta capacidad antioxidante, y se han observado mejoras en la memoria y en la actividad motora de estos ratones, un descenso de la hipersensibilidad a PTZ, y una reducción de la degeneración neuronal y la gliosis. Por lo tanto, se considera que estos tratamientos o combinaciones de los mismos podrían ser beneficiosos en pacientes con esta enfermedad y deberían ser evaluados en ensayos clínicos. Por último, se ha comprobado la presencia de cuerpos de Lafora en el corazón de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} y se ha observado una hipertrofia del ventrículo izquierdo con pérdida de función sistólica, por lo que se considera importante la evaluación del fenotipo cardíaco en pacientes con enfermedad de Lafora.

SUMMARY

Lafora disease is a progressive myoclonus epilepsy caused by mutations either in the EPM2A gene, encoding laforin, or in the EPM2B gene, encoding malin. The main feature of the disease is the presence of Lafora bodies, aggregates similar to glycogen, in brain and other tissues. *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice show many of the alterations observed in patients with the disease, and represent a good tool in the search for new treatments. An enhanced sensitivity to the convulsant agent PTZ has been described in both mouse models. In this work, we have also found that the generalized seizures in response to PTZ have a specific EEG pattern, which differs from the control group, and that the increased sensitivity to this agent is not present in early stages of life. These mouse models also present alterations in glycogen metabolism, in protein clearance mechanisms (e.g., autophagy) and show oxidative stress. We have treated *Epm2b*^{-/-} mice with 4-PBA, a chemical chaperone that reverses misfolding and aggregation of proteins, and with metformin, an activator of AMPK. These treatments, in addition to the previously described effects, also reduced the sensitivity to PTZ in both mouse models. We also treated *Epm2b*^{-/-} mice with sodium selenate, a drug that present a potent antioxidant activity and we found improvements in memory performance and motor activity, a reduction in the response to PTZ and a decreased neuronal loss and gliosis. Thus, we consider that these treatments, or some of their combinations, must be evaluated in clinical trials, as they may also provide some beneficial effects in patients with Lafora disease. Finally, we have confirmed the presence of Lafora bodies in the heart of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice, and we have observed that both models present left ventricular hypertrophy and loss of systolic function. Therefore, in our opinion, patients with Lafora disease should be evaluated for the presence of cardiac alterations.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Lafora (OMIM 254780, ORPHA501) es una forma de epilepsia mioclónica progresiva de inicio en la adolescencia caracterizada por crisis epilépticas resistentes al tratamiento médico, mioclonías y deterioro neurológico progresivo que generalmente lleva al fallecimiento de los pacientes en 5-10 años. El marcador biológico distintivo son los cuerpos de Lafora, agregados anormales de un material similar al glucógeno que se acumulan en el cerebro y otros órganos. La forma de herencia es autosómica recesiva, existiendo dos genes implicados: *EPM2A (epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A)* (que codifica para laforina) y *NHLRC1/EPM2B (NHL repeat-containing protein 1/epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene B)* (que codifica para malina) (Minassian et al., 1998, Serratosa et al., 1999, Chan et al., 2003b). La enfermedad fue descrita por el neurólogo español Gonzálo Rodríguez Lafora en el año 1911 durante una estancia en Washington DC (Lafora, 1911, Lafora and Glueck, 1911). Se trata de una enfermedad rara, definida por afectar a menos de una persona de cada 2000. La prevalencia varía según países, siendo mayor en regiones con una mayor consanguinidad como Oriente Medio, Norte de África, India y Pakistán.

1. Síntomas clínicos

La enfermedad de Lafora se inicia en la adolescencia, entre los 10 y los 18 años, tras un desarrollo aparentemente normal. Los primeros síntomas son casi siempre las crisis epilépticas, que son de los siguientes tipos: generalizadas tónico-clónicas, clónicas, mioclónicas, visuales y ausencias. Posteriormente aparecen alteraciones cognitivas con retraso escolar, alteraciones del lenguaje y ataxia. Los déficits intelectuales se agravan progresivamente y los pacientes acaban presentando una demencia grave. Las crisis epilépticas son difíciles de controlar con fármacos y las mioclonías terminan por ser continuas.

Al inicio de la enfermedad, el electroencefalograma (EEG) suele mostrar una actividad de fondo normal o algo lenta, sobre la que destacan descargas de punta-onda o polipunta onda generalizada siendo muy frecuente la fotosensibilidad. Al evolucionar la enfermedad, la actividad de fondo se vuelve más lenta, aparecen más

descargas y comienzan a aparecer anomalías epileptiformes focales o multifocales, en ocasiones más marcadas en regiones occipitales. Los patrones fisiológicos del sueño tienden a desaparecer desde el inicio. Para mediados de la tercera década de vida, la mayoría de los individuos afectados han fallecido o se encuentran en un estado vegetativo con mioclonías continuas que les confina a una silla de ruedas o al encamamiento (Van Heycop Ten Ham, 1974, Tassinari et al., 1978, Roger et al., 1983, Berkovic et al., 1986, Roger, 1992, Acharya et al., 1995, Jansen, 2007).

Aunque la imagen por resonancia magnética es normal en las primeras fases de la enfermedad, pueden observarse diversos grados de atrofia cerebral en estadios avanzados. Algo similar ocurre con la espectroscopia por resonancia magnética, en la que según avanza la enfermedad se puede detectar un descenso del ratio N-acetil aspartato/creatinina (NAA/Cr) en corteza frontal y occipital, ganglios basales y cerebelo, así como del ratio N-acetil aspartato/mioinositol (NAA/Myo) en la sustancia gris y blanca frontal, y del ratio N-acetil aspartato/colina (NAA/Cho) en el cerebelo (Villanueva et al., 2006). En los estudios de tomografía por emisión de positrones se ha descrito hipometabolismo en regiones posteriores y en corteza sensitivo-motora (Tsuda et al., 1995, Jennesson et al., 2010, Shandal et al., 2012).

Hasta el momento no existen tratamientos específicos para la enfermedad de Lafora y solamente se pueden tratar las crisis epilépticas con fármacos antiepilépticos, a los que los pacientes son muy resistentes.

2. Características histopatológicas

La principal característica histopatológica de la enfermedad de Lafora es el acúmulo de cuerpos de Lafora, inclusiones intracelulares de polímeros similares al glucógeno, también llamados poliglucosanos, insolubles y pobremente ramificados (Lafora and Glueck, 1911). Se ha descrito su presencia en cerebro, hígado, músculo esquelético y cardíaco, piel y otros tejidos (Van Heycop Ten Ham, 1974). En el cerebro se localizan en el pericarion y en las dendritas, característica particular de la enfermedad, ya que los poliglucosanos fisiológicos se encuentran en axones y células gliales (Van Heycop Ten Ham, 1974, Roger, 1992). Estas inclusiones citoplasmáticas son

positivas para la tinción del ácido periódico de Schiff (*periodic acid-Schiff*, PAS), su rango de tamaño varía entre 3 y 40 μm y su presencia en las glándulas sudoríparas de la piel es patognomónica de la enfermedad (Carpenter and Karpati, 1981). Los pacientes con enfermedad de Lafora también muestran una abundante pérdida de neuronas sin que se observe desmielinización ni inflamación. Todas las regiones del sistema nervioso central se ven involucradas en este proceso, principalmente el hipocampo, la corteza cerebral y cerebelosa, los ganglios basales, los núcleos del cerebelo y el tálamo (Schwarz and Yanoff, 1965, Carpenter et al., 1974, Van Heycop Ten Ham, 1974). Por otro lado, a pesar de que el corazón de los pacientes presenta abundantes cuerpos de Lafora, hasta el momento se han descrito muy pocos casos de pacientes con alteraciones cardíacas (de Graaf et al., 1989, Oksel et al., 1999, Wick and Byard, 2006), y no se han llevado a cabo estudios funcionales de miocardio en pacientes.

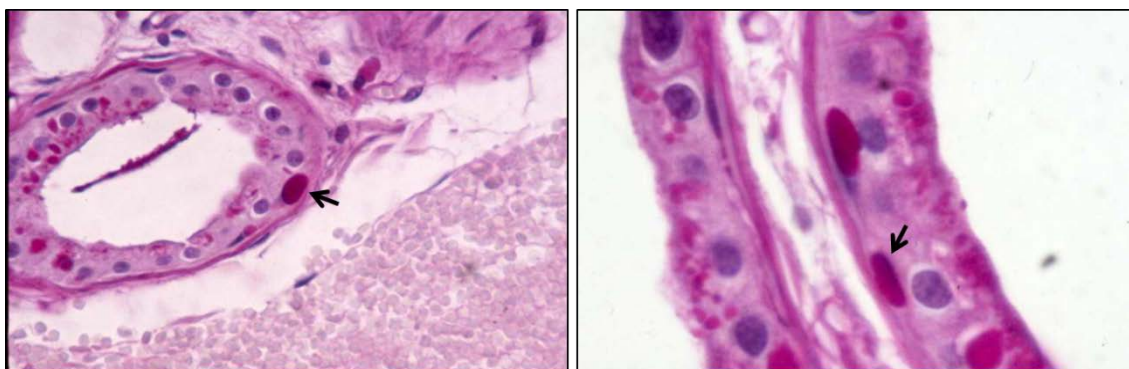


Figura 1. Biopsia axilar de un paciente con cuerpos de Lafora (flechas) en células mioepiteliales de glándulas apocrinas con tinción de PAS.

3. Genes y proteínas

Las investigaciones genéticas moleculares de la enfermedad de Lafora se iniciaron en 1995 cuando los neurólogos José Serratosa y Antonio Delgado-Escueta descubrieron que un gen responsable de la enfermedad se localizaba en el cromosoma 6q24.3 (Serratosa et al., 1995). Posteriormente se describieron mutaciones en los genes *EPM2A* (Minassian et al., 1998, Serratosa et al., 1999) y *NHLRC1/EPM2B* (Chan et al., 2003b) como causales de la enfermedad. Los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2B* parecen tener un fenotipo ligeramente más leve que los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2A* (Gomez-Abad et al., 2005). Además, se han descrito

variaciones fenotípicas importantes asociadas a distintas mutaciones en el mismo gen e incluso a la misma mutación, por lo que se sugiere que factores modificadores genéticos o epigenéticos, podrían ser responsables de la edad de inicio y la gravedad de la enfermedad (Jara-Prado et al., 2014).

El gen *EPM2A* (OMIM 607566), que codifica la proteína laforina (Minassian et al., 1998, Serratosa et al., 1999), se organiza en 4 exones. Las mutaciones en este gen son responsables de alrededor del 60 % de los casos de la enfermedad de Lafora. Se trata de un gen altamente conservado que se expresa en todos los órganos y tejidos analizados: corazón, cerebro, músculo esquelético, hígado, pulmón, riñón, timo, ovarios, próstata, bazo, testículo, estómago, colon, páncreas, linfocitos y piel (Serratosa et al., 1999, Ganesh et al., 2001). Hasta la fecha se han descrito alrededor de 50 mutaciones distintas y varios polimorfismos en el gen *EPM2A*. Estas se distribuyen a lo largo de los 4 exones e incluyen delecciones, inserciones, mutaciones con cambio de sentido y sin sentido (Ianzano et al., 2005, Singh and Ganesh, 2009) (base de datos de mutaciones y polimorfismos de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora: <http://projects.tcag.ca/lafora/>).

La proteína laforina (NP_005661) es una fosfatasa de especificidad doble capaz de hidrolizar sustratos de fosfotirosina y fosfoserina/treonina. Para poder desempeñar esa función, la región carboxilo terminal contiene un dominio fosfatasa de especificidad doble (*dual specificity phosphatase*, DSP) (Minassian et al., 1998, Serratosa et al., 1999, Ganesh et al., 2000). Además, la región amino-terminal contiene un dominio de unión a carbohidratos (*carbohydrate binding domain*, CBD) que promueve su unión a glucógeno (Wang et al., 2002, Worby et al., 2006) y a los cuerpos de Lafora (Chan et al., 2004). Laforina es capaz de interactuar con distintas proteínas celulares, entre ellas malina (Gentry et al., 2005), R5/PTG (*protein targeting to glycogen*) (Fernandez-Sanchez et al., 2003), glucógeno sintasa (*glycogen synthase*, GS) (Worby et al., 2006), EPM2AIP1 (*EPM2A interacting protein 1*) (Ianzano et al., 2003) y HIRIP5 (*HIRA-interacting protein 5*) (Ganesh et al., 2003). Recientemente, se ha cristalizado la proteína laforina unida a maltohexaosa y fosfato, y se ha descrito la estructura terciaria y cuaternaria de esta proteína (Raththagala et al., 2015). Se han

descrito 5 isoformas diferentes de la proteína generadas por procesamiento alternativo de su RNA. Las dos primeras que se describieron presentan un segmento común con un dominio CBD y un dominio DSP, y secuencias C-terminales alternativas. La isoforma de 331 aminoácidos con actividad fosfatasa se localiza en el retículo endoplasmático rugoso y la isoforma de 317 aminoácidos, que es inactiva, se localiza en el núcleo (Ganesh et al., 2002b, lanzano et al., 2004, Dubey and Ganesh, 2008). Posteriormente, se describieron otras tres isoformas que se localizan en el citoplasma, la isoforma de 177 aminoácidos, que presenta actividad fosfatasa, y las isoformas inactivas de 244 y 152 aminoácidos (Dubey et al., 2012). Se pueden formar homodímeros o heterodímeros entre las isoformas activas y/o inactivas y regular así la actividad fosfatasa de la enzima (Ganesh et al., 2002b, lanzano et al., 2004, Dubey and Ganesh, 2008, Dubey et al., 2012).

El gen *EPM2B* (o *NHLRC1*, OMIM 608072) está localizado en el cromosoma 6p22.3 (Chan et al., 2003a), se compone de un solo exón y codifica la proteína malina. Las mutaciones en este gen son responsables de alrededor del 40% de los casos de la enfermedad de Lafora (Chan et al., 2003b, Gentry et al., 2005). Hasta el momento se han descrito unas 60 mutaciones distintas y varios polimorfismos en el gen *EPM2B*, que incluyen delecciones, inserciones, así como cambios de aminoácidos e introducción de codones de parada (lanzano et al., 2005, Singh and Ganesh, 2009) (base de datos de mutaciones y polimorfismos de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora: <http://projects.tcag.ca/lafora/>). La proteína malina (NP_940988) es una proteína ligasa de ubiquitina E3. Esta proteína presenta un dominio RING (*really interesting new group of proteins*) *finger* (un tipo específico de dedo de cinc, *zinc finger*) con actividad ligasa de ubiquitina E3 (Gentry et al., 2005). La modificación de las proteínas por ubiquitina, proceso denominado ubiquitinación, se lleva a cabo a través de una sucesión de eventos en la que participan las enzimas E1 (activadora de ubiquitina), E2 (conjugadora de ubiquitina) y E3 (ligasa de ubiquitina). Este proceso a menudo lleva a la degradación de la proteína por el proteosoma o, de forma alternativa, a un cambio en la actividad, en la capacidad de unión o en la localización de la proteína (Hershko and Ciechanover, 1998, Pickart, 2001). La proteína malina es capaz de auto-ubiquitinarse cuando se sobreexpresa en células y de ubiquitinar sustratos como la laforina, la GS, la enzima

ramificante del glucógeno y la PTG, induciendo su degradación (Gentry et al., 2005, Lohi et al., 2005, Cheng et al., 2007, Solaz-Fuster et al., 2008, Vilchez et al., 2007, Worby et al., 2008). Además, la malina contiene seis dominios repetidos NHL en la región carboxilo-terminal (descritos por primera vez en las proteínas Ncl-1, HT2A y Lin-41) (Slack and Ruvkun, 1998) implicados en la interacción proteína-proteína, que le permiten interaccionar también con laforina (Pickart, 2001, Chan et al., 2003b, Gentry et al., 2005, Solaz-Fuster et al., 2008). Mediante esta interacción, malina puede poli-ubiquitinar a laforina, promoviendo así su eliminación a través del sistema del proteosoma. Por lo tanto, la proteína laforina tiene dos mecanismos fundamentales de regulación, por una parte se auto-regula a través del procesamiento alternativo del RNA y la formación de homodímeros/heterodímeros activos o inactivos (Dubey and Ganesh, 2008), y por otra, se regula mediante su interacción con malina (Gentry et al., 2005).

El gen homólogo del *EPM2A* humano en el ratón, el *Epm2a* (NM_010146), también se organiza en cuatro exones. Codifica para la proteína laforina de ratón, que se compone de 330 aminoácidos (NP_034276) y cuya secuencia muestra una homología del 89% con la laforina humana (Ganesh et al., 1999). El gen homólogo del *EPM2B* humano en el ratón, el *Epm2b* (NM_175340), al igual que en humanos, se organiza en un solo exón. Codifica para la proteína malina de ratón (NP_780549) que se compone de 401 aminoácidos y cuya secuencia muestra una homología del 82% con la malina humana.

4. Modelos animales

Desde la identificación de los genes implicados en la enfermedad de Lafora se han generado varios modelos de ratón para estudiar la función de las proteínas laforina y malina y su papel en el desarrollo de la enfermedad. Existe un modelo nulo del gen *Epm2a* en ratón (Ganesh et al., 2002a), así como varios modelos transgénicos que expresan el gen de la laforina mutado (Chan et al., 2004, Gayarre et al., 2014). También se han generado varios modelos de ratón por manipulación genética del gen

Epm2b (DePaoli-Roach et al., 2010, Turnbull et al., 2010, Valles-Ortega et al., 2011, Criado et al., 2012).

El ratón nulo para la expresión de laforina (*Epm2a*^{-/-}) se generó mediante la eliminación del cuarto exón del gen *Epm2a*, que codifica el dominio fosfatasa de especificidad doble de la laforina (Ganesh et al., 2002a). El fenotipo resultante de la pérdida de expresión del gen *Epm2a* en ratón muestra muchas de las características presentes en los pacientes con enfermedad de Lafora con mutaciones en el gen *EPM2A*. Los ratones nulos para la expresión de laforina presentan un desarrollo normal y son fértiles, pero muestran alteraciones del comportamiento a los 4 meses de edad y signos de ataxia y epilepsia mioclónica a partir de los 9 meses. Estos ratones presentan inclusiones citoplasmáticas similares a los cuerpos de Lafora presentes en los pacientes a partir de los primeros meses de edad. Estos cuerpos de Lafora de ratón aumentan de tamaño y número con la edad y contienen ubiquitina. Las regiones más afectadas por estas inclusiones incluyen hipocampo, cerebelo, corteza cerebral, tálamo y núcleos motores del troncoencéfalo, que corresponden a las zonas donde se expresa mayoritariamente la laforina humana (Ganesh et al., 2001, Ganesh et al., 2002a). A partir de los 9 meses de edad también se pueden ver cuerpos de Lafora en músculo esquelético e hígado. Además, a partir de los 2 meses de edad, se observa una degeneración neuronal generalizada con un aumento en el tamaño de los orgánulos sub-celulares, anormalidades estructurales, y muerte celular sin apoptosis ni fragmentación del DNA (Ganesh et al., 2002a). A partir de los 3 meses de edad los ratones *Epm2a*^{-/-} también muestran actividad epileptiforme en los registros vídeo-EEG (puntas, polipuntas y complejos de punta-onda y polipunta-onda) que se corresponden con mioclonías, y crisis generalizadas tónico-clónicas con convulsiones y descargas de polipunta-onda de alta frecuencia en el EEG (Garcia-Cabrero et al., 2012). La muerte neuronal y los cuerpos de Lafora preceden a las alteraciones de comportamiento, a la ataxia, a la epilepsia mioclónica y a la actividad epileptiforme del EEG (Ganesh et al., 2002a, Machado-Salas et al., 2012).

El ratón nulo para la expresión de malina (*Epm2b*^{-/-}) (Criado et al., 2012) es una línea de ratón generada por la eliminación del único exón del gen *Epm2b*. Este modelo

presenta un fenotipo similar tanto al observado en pacientes con enfermedad de Lafora como al descrito previamente en el modelo *Epm2a*^{-/-}. A partir de los primeros meses de edad, estos ratones muestran abundantes cuerpos de Lafora en corteza cerebral, hipocampo y cerebelo, así como en músculo esquelético y corazón. También presentan alteraciones neurológicas y de comportamiento que pueden ser consecuencia de la presencia de estos agregados en cerebro, así como actividad epileptiforme en los registros de vídeo-EEG, con puntas, polipuntas y complejos punta-onda y polipunta-onda que se corresponden con mioclonías (Criado et al., 2012, Garcia-Cabrero et al., 2012). Además, estos ratones presentan defectos en la macroautofagia previos a la aparición de los primeros cuerpos de Lafora (Criado et al., 2012).

La generación de modelos animales con un fenotipo muy similar al de los pacientes con la enfermedad de Lafora, ha representado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de esta enfermedad. Así, por ejemplo, se ha visto que existe una relación funcional entre las proteínas laforina y malina y el metabolismo del glucógeno en estos ratones, como se describirá más adelante. Al observarse esta relación y dado que los cuerpos de Lafora contienen una forma insoluble y pobremente ramificada de glucógeno, se ha sugerido que uno de los mecanismos implicados en esta enfermedad puede ser la desregulación del metabolismo del glucógeno. Además, en estos modelos de la enfermedad de Lafora se ha observado que existe una deficiencia en la eliminación de proteínas y que presentan estrés oxidativo, como también se detallará a continuación.

5. Metabolismo de glucógeno

El glucógeno es la principal fuente de almacenamiento de glucosa en animales y en células humanas. Se produce principalmente en el hígado y en el músculo, siendo los niveles de glucógeno en el cerebro muy bajos en comparación con los de estos dos tejidos. En el sistema nervioso central, en estadios embrionarios, el glucógeno aparece en células gliales y neuronales, pero en adultos este polisacárido se encuentra casi exclusivamente en los astrocitos (Cataldo and Broadwell, 1986). A pesar de ello, se ha

demostrado que las neuronas tienen un metabolismo de glucógeno activo (Saez et al., 2014), pero mantienen bajas concentraciones de glucógeno ya que su acumulación intracelular induce apoptosis (Vilchez et al., 2007). El glucógeno se produce por la acción de la GS, la única enzima capaz de sintetizar polímeros de glucosa en mamíferos, y es degradado por la glucógeno fosforilasa (*glycogen phosphorylase*, GP). Los mamíferos expresan dos isoformas de la GS, la GYS1 y la GYS2. La GYS2 sólo se expresa en el hígado, mientras que la GYS1, que codifica para la isoforma de la glucógeno sintasa de músculo (*muscle glycogen synthase*, MGS), se expresa en la mayoría de los tejidos, incluyendo el cerebro (Kaslow et al., 1985). La enzima MGS se regula por fosforilación de los dominios N- y C- terminales mediada por varias quinasas, incluyendo la glucógeno sintasa quinasa 3 (*glycogen synthase kinase3*, GSK3), que induce la inactivación de la enzima (Roach et al., 1998, Bouskila et al., 2008). Además, la presencia de altos niveles de glucosa-6 fosfato (*glucose-6-phosphate*, G6P) activa alostéricamente a la enzima MGS incluso cuando está fosforilada, siendo éste el mecanismo principal por el que la insulina promueve la acumulación de glucógeno en músculo (Bouskila et al., 2010).

Tanto el modelo nulo para la expresión de la proteína laforina, como el modelo nulo para la expresión de la proteína malina, tienen niveles elevados de glucógeno y de fosforilación total de glucógeno (Tagliabracci et al., 2007, Turnbull et al., 2010, DePaoli-Roach et al., 2015). Además, el complejo laforina-malina bloquea el acúmulo de glucógeno en neuronas en cultivo por la inducción de la degradación dependiente de proteosoma de la enzima MGS y de PTG. PTG es una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 (*protein phosphatase 1*, PP1), responsable de la activación de MGS por desfosforilación (Vilchez et al., 2007). Se han realizado estudios que muestran que la eliminación de PTG en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} revierte el fenotipo patológico de la enfermedad de Lafora a nivel histológico y molecular (Turnbull et al., 2011, Turnbull et al., 2014). Otro estudio en el que se inhibió la actividad de la GS en el modelo *Epm2a*^{-/-} también consiguió eliminar el fenotipo patológico de esta enfermedad (Pederson et al., 2013). Además, con la generación de un ratón doble mutante de malina y MGS, se vinculó directamente la degeneración neuronal con la acumulación de glucógeno, ya que estos ratones dejaron de mostrar varias de las

características patológicas presentes en los ratones *Epm2b*^{-/-}, entre ellas la presencia de marcadores de neurodegeneración (Duran et al., 2014). Todos estos resultados sugieren que el metabolismo del glucógeno tiene un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad.

6. Proteostasis y estrés oxidativo

Además de los polímeros de glucógeno, los cuerpos de Lafora contienen un 6% de diversas proteínas (Sakai et al., 1970, Yokoi et al., 1975). Estos acúmulos se marcan con anticuerpos anti-ubiquitina (Ganesh et al., 2002a, Rao et al., 2010, Criado et al., 2012, Garcia-Cabrero et al., 2012) y presentan chaperonas y subunidades del proteosoma (Rao et al., 2010, Sinadinos et al., 2014), por lo que también se ha sugerido que la enfermedad de Lafora podría ser una enfermedad causada por deficiencia en la eliminación de proteínas (Delgado-Escueta, 2007). La homeostasis de proteínas, o proteostasis, requiere la coordinación dinámica del plegamiento eficiente de las proteínas recién sintetizadas y de los mecanismos de degradación de la célula para reducir la carga de proteínas sin plegar o mal plegadas, evitando así la agregación anormal de proteínas (Hetz and Mollereau, 2014). El retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*, ER) es el compartimento subcelular para la síntesis y plegamiento de la mayoría de las proteínas. El funcionamiento del ER es muy sensible al estrés que perturba tanto los niveles energéticos celulares, como el estado redox o la concentración de calcio. Este estrés reduce la capacidad de plegamiento de proteínas del ER, lo que resulta en la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas en el lumen. Estas proteínas son poliubiquitiniladas y son degradadas. En células de mamíferos, el sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia son los principales sistemas de degradación de proteínas (Knecht et al., 2009). Además, las condiciones de estrés del ER se asocian con la generación de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) por parte del ER (Yoshida, 2007, Lin et al., 2008, Zhang and Kaufman, 2008). La producción de ROS derivada del estrés del ER contribuye al establecimiento del status de estrés oxidativo celular, que es perjudicial para la célula.

El complejo laforina-malina interviene en la protección de las células frente a las condiciones de estrés del ER. De hecho, en modelos de células en cultivo con eliminación de malina o laforina se ha descrito un incremento del estrés del ER, el cual desencadena una disminución de la función del proteosoma y un incremento de la apoptosis (Liu et al., 2009, Vernia et al., 2009, Rao et al., 2010, Zeng et al., 2012). También se ha visto que el complejo laforina-malina suprime la toxicidad celular de proteínas mal plegadas promoviendo su degradación a través del complejo ubiquitina-proteosoma (Garyali et al., 2009). Por otra parte, se han descrito defectos en autofagia tanto en el modelo *Epm2a*^{-/-} (Aguado et al., 2010) como en el *Epm2b*^{-/-} (Criado et al., 2012), además de en células de ambos modelos (Garyali et al., 2014), y se ha propuesto que estas alteraciones están relacionadas con un incremento en la actividad de la diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin kinase*, mTOR)(Aguado et al., 2010, Singh et al., 2013, Garyali et al., 2014).

Por otro lado, existe una relación entre los defectos en las distintas vías de proteólisis celular y la generación de ROS. La acumulación de proteínas mal plegadas y los agregados de proteínas no funcionales actúan como dianas de ROS, produciéndose una acumulación de proteínas oxidadas. En condiciones celulares normales, esta acumulación se corrige a través del sistema de ubiquitina-proteosoma (Kriegenburg et al., 2011). Además, se cree que la autofagia también podría ser la vía para la eliminación de estos agregados proteicos cuando la actividad del proteosoma está saturada (Filomeni et al., 2015). Por ello, en el caso de fallos en los sistemas de ubiquitina-proteosoma o en los procesos de autofagia, como es el caso de la enfermedad de Lafora, estos agregados se acumulan. Los elementos de la respuesta antioxidante proporcionan una respuesta de defensa para la prevención de los efectos deletéreos de la oxidación y acumulación de proteínas. Por lo tanto, fallos en los sistemas antioxidantes también pueden empeorar esta acumulación.

En pacientes con enfermedad de Lafora, hay un incremento de los niveles de 8-hidroxi-20-desoxiguanosina y 8-hidroxiguanosina (marcadores de daño oxidativo en DNA y RNA) en corteza cerebral y en orina (Hayashi, 2009). En fibroblastos de pacientes con enfermedad de Lafora y mutaciones en el gen de laforina, se han

descrito alteraciones de la actividad proteosomal que se corresponden con un descenso en los niveles de tioredoxina 1 (TRX1), proteína que actúa como antioxidante. Además, también se ha observado una disminución en la localización nuclear tanto de TRX1 como del proteosoma, localización que ha sido relacionada con una respuesta antioxidante activa (Garcia-Gimenez et al., 2013). En otro estudio realizado tanto en fibroblastos de pacientes con mutaciones en laforina y malina, como en modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de ratón, se muestra un desequilibrio en los niveles de expresión de ciertas enzimas antioxidantes además de un descenso de su actividad enzimática. Estas alteraciones afectan a las enzimas superóxido dismutasa citosólica (CuZnSOD) y mitocondrial (MnSOD), y a la catalasa. También se ha observado en el modelo *Epm2b*^{-/-} de ratón un incremento de peróxidos lipídicos en plasma, valor indicativo de estrés oxidativo crónico, como consecuencia de una producción excesiva de ROS. Además, el análisis proteómico del cerebro de estos ratones ha revelado un incremento en la proteína peroxirredoxina-6 (PRX6) modificada postraduccionalmente (Roma-Mateo et al., 2015a). La sobreexpresión de formas modificadas de esta proteína se ha relacionado con estrés oxidativo y alteraciones proteolíticas en otras enfermedades neurodegenerativas (Yata et al., 2011, Yun et al., 2013).

Las mitocondrias son la principal fuente de ROS en la célula y la homeostasis mitocondrial está vinculada con la autofagia (Lee et al., 2012). Las mitocondrias de los fibroblastos de pacientes con enfermedad de Lafora que presentan mutaciones tanto en laforina como en malina, muestran una morfología anómala, un descenso en el potencial de membrana y en la producción de ATP, y un incremento en los niveles de ROS, especialmente en la producción de superóxidos. Las mitocondrias de estas células han perdido su morfología y forman agregados, lo que contribuye a una pérdida del potencial de membrana de las mitocondrias y una baja eficiencia de la cadena de transporte (Roma-Mateo et al., 2015a).

Por otro lado, en el modelo *Epm2a*^{-/-} se ha descrito la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en forma de ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*, NFTs) en cerebro y músculo esquelético. Por ello se ha propuesto que laforina, a través de su dominio fosfatasa, podría unirse y desfosforilar a tau. Además, la hiperfosforilación de

tau se ha asociado con niveles elevados de la forma activa de la GSK3 beta (GSK3 β)(Puri et al., 2009).

7. Sensibilidad a pentilenotetrazol (PTZ)

Recientemente se ha descrito que tanto el modelo *Epm2a*^{-/-} (Ganesh et al., 2002a), como el modelo *Epm2b*^{-/-} (Criado et al., 2012) presentan una mayor sensibilidad al agente epileptógeno pentilenotetrazol (PTZ) (Garcia-Cabrero et al., 2014). El PTZ es un antagonista del receptor del ácido γ -aminobutírico tipo A (*gamma-aminobutyric acid type A*, GABA_A) (Stone, 1970) y se utiliza como modelo farmacológico de crisis epilépticas generalizadas. A dosis bajas en animales de experimentación induce ausencias similares a las crisis de ausencia descritas en algunos pacientes con epilepsia, de igual manera que todos los antagonistas del receptor GABA_A (Snead et al., 2000), mientras que dosis de 50 mg/kg de PTZ (dosis convulsivas) producen crisis generalizadas tónico-clónicas en aproximadamente el 50% de los ratones control (Erakovic et al., 2001, Eloqayli et al., 2003). Al inducir crisis generalizadas tónico-clónicas (Woodbury, 1980, Coimbra et al., 2001a, Coimbra et al., 2001b), el PTZ se usa como test de rutina para probar distintos agentes antiepilépticos (Swinyard, 1989). Las crisis epilépticas se desarrollan normalmente dentro de los 20 min tras la inyección de PTZ. Los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} muestran una mayor sensibilidad a desarrollar mioclonías a dosis sub-convulsivas de PTZ, y un menor umbral y menor tiempo de latencia para desarrollar crisis generalizadas tónico-clónicas con dosis convulsivas (Garcia-Cabrero et al., 2014).

8. Nuevos tratamientos en modelos animales

Un estudio reciente muestra los efectos de la administración de ácido 4-fenilbutírico (*4-phenylbutyrate* o *4-phenylbutyric acid*, 4-PBA) y de metformina en ratones *Epm2b*^{-/-} (Berthier et al., 2015). El 4-PBA actúa como una chaperona química que revierte el mal plegamiento y la agregación de proteínas asociadas con diversas enfermedades neurodegenerativas. En un modelo celular de Alzheimer, el 4-PBA revierte el mal plegamiento de proteínas desencadenado por estrés del ER inducido farmacológicamente (Wiley et al., 2010). También se ha descrito que el 4-PBA modera

el estrés oxidativo y la agregación proteica en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, ralentizando la progresión de dicha enfermedad (Zhou et al., 2011). Además, el tratamiento con 4-PBA en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer produce un incremento en la acetilación de las histonas, lo que induce un incremento de proteínas marcadoras de integridad y plasticidad sináptica, y mejoras en la memoria de estos ratones (Ricobaraza et al., 2009). En el estudio citado anteriormente se describe cómo en el modelo nulo para la expresión de malina *Epm2b*^{-/-}, el 4-PBA produce un incremento de la chaperona BIP/Grp78 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78*), que está involucrada en la mejora de la disfunción proteostática. Este tratamiento reduce, además, el número de cuerpos de Lafora, de agregados de poliubiquitina, y frena la neurodegeneración, produciendo una mejora en el comportamiento de estos animales (Berthier et al., 2015).

Como se ha indicado anteriormente, también se han realizado tratamientos con metformina en ratones *Epm2b*^{-/-} (Berthier et al., 2015). La metformina es comúnmente utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y activa la proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK). La AMPK, además de otras funciones, puede promover la autofagia a través de la inhibición de mTOR o a través de la fosforilación de ULK1 (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*, ULK1) (Carling et al., 2012). Además, la metformina puede actuar como agente neuroprotector en diversas enfermedades (Poels et al., 2009, Han et al., 2011). En el modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora, la metformina activa la AMPK, aunque los niveles de los marcadores de autofagia no se ven afectados. Sin embargo, igual que el tratamiento con 4-PBA, el tratamiento con metformina reduce el número de cuerpos de Lafora, los agregados de poliubiquitina y la degeneración neuronal, y se observa una mejora de comportamiento de los ratones nulos para la expresión de la proteína malina (Berthier et al., 2015).

Además, en el presente trabajo se han realizado tratamientos con selenato sódico en el modelo *Epm2b*^{-/-} de enfermedad de Lafora (Criado et al., 2012). El selenato sódico es una forma oxidada del selenio, un oligoelemento esencial con efectos

antioxidantes y antiinflamatorios, que está implicado en la producción de la hormona tiroidea activa (Rayman, 2000, Benton, 2002, Brenneisen et al., 2005). El selenato sódico regula la expresión y actividad de selenoenzimas y por lo tanto protege frente al daño celular inducido por el estrés oxidativo, que conduce a la aparición de enfermedades neuropsiquiátricas y otros trastornos como enfermedades cerebrovasculares, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el trastorno obsesivo compulsivo, y la epilepsia (Rehni and Singh, 2013). Niveles bajos de selenio se han asociado con el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer y con una mayor predisposición a presentar crisis epilépticas en humanos y en animales de laboratorio (Akbaraly et al., 2007, Cardoso et al., 2010, Rehni and Singh, 2013). También se ha descrito que el selenato sódico regula la fosforilación de algunas proteínas clave involucradas en el estrés oxidativo, el metabolismo energético y la degradación de proteínas en modelos animales de diferentes patologías (Chen et al., 2014). Además, el selenato sódico también reduce los niveles de la proteína tau hiperfosforilada mediante la activación de la proteína fosfatasa 2 A (*protein phosphatase 2 A*, PP2A) (Corcoran et al., 2010b, van Eersel et al., 2010, Jones et al., 2012).

En resumen, la enfermedad de Lafora es una epilepsia mioclónica progresiva de mal pronóstico que presenta procesos neurodegenerativos en los que parecen estar implicados diversos mecanismos como fallos en el metabolismo del glucógeno y en los sistemas de degradación de proteínas, factores que desencadenan procesos de estrés oxidativo. Recientemente, han sido muchos los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en esta enfermedad y esto ha sido debido, principalmente, a la generación de modelos animales que representan una buena herramienta para la búsqueda de tratamientos. A pesar de estos avances, en la actualidad no existen tratamientos efectivos para tratar a pacientes con enfermedad de Lafora. En este trabajo se han utilizado estos modelos para profundizar en el conocimiento de la enfermedad y buscar tratamientos potenciales que puedan ser trasladados a los pacientes.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar nuevos tratamientos que puedan mejorar los síntomas de los pacientes con la enfermedad de Lafora, utilizando dos modelos experimentales de la enfermedad. En primer lugar se planteó profundizar en el conocimiento de los fenotipos de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}, para posteriormente realizar varios tratamientos con tres fármacos. Los objetivos concretos son:

1. Completar la descripción del fenotipo epiléptico en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} evaluando su respuesta al agente epileptógeno PTZ.
2. Evaluar los efectos de varios tratamientos en el modelo *Epm2b*^{-/-}:
 - Analizar el fenotipo epiléptico tras el tratamiento con 4-PBA.
 - Analizar el fenotipo epiléptico tras el tratamiento con metformina.
 - Analizar los efectos del tratamiento con selenato sódico sobre las alteraciones del comportamiento motor y la memoria, y sobre el fenotipo epiléptico y la histopatología.
3. Estudiar el posible mecanismo de acción del selenato sódico: Evaluar la posible presencia de la proteína tau hiperfosforilada en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.
4. Caracterizar las alteraciones funcionales e histológicas del miocardio en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

El empleo de los animales de experimentación se llevó a cabo en riguroso cumplimiento de las directrices establecidas por la Unión Europea (2010/63/UE) y de la legislación española vigente en cuanto al empleo, protección y cuidado de los animales de experimentación (Real decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el Comité de Investigación Animal de nuestra Institución.

1.1. Ratones *Epm2a*^{-/-}

Los ratones *Epm2a*^{-/-} corresponden a una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2a*, generada mediante la eliminación del cuarto exón del gen. Fueron amablemente cedidos por el Dr. Delgado-Escueta de la Universidad de California en Los Ángeles, EEUU (Ganesh et al., 2002a).

1.2. Ratones *Epm2b*^{-/-}

La línea de ratones *Epm2b*^{-/-}, nulos para la expresión del gen *Epm2b*, se generó mediante la eliminación del único exón del gen que codifica la proteína malina. Estos experimentos se realizaron en GenOway, Lyon, France (Criado et al., 2012).

1.3. Ratones control

Para el grupo control se emplearon ratones de la cepa C57BL/6J (Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, Francia) ya que los ratones nulos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} se generaron originariamente en el fondo genético 129Sv;C57BL/6J.

1.4. Mantenimiento de los animales

Los ratones han sido mantenidos en el animalario de nuestra Institución en jaulas de tamaño estándar ventiladas individualmente, sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a comida (dieta estándar, Safe Scientific Animal Food & Engineering, Augy, Francia) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron utilizando el mínimo número de animales posible por experimento y reduciendo al máximo su sufrimiento.

1.5. Genotipado

Se genotiparon ratones control y ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de diferentes edades y sexo de forma aleatoria. A cada uno de ellos se les seccionó un fragmento de aproximadamente 3mm de longitud de la punta de la cola para la extracción y amplificación de ADN con el kit KAPA Mouse Genotyping kit (Cultek, Boston, MA, EEUU). Los oligonucleótidos cebadores empleados se representan en la Tabla 1. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 3 min a 95°C, 35 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 57°C y 30seg a 72°C, y elongación final 5 min a 72°C (Veriti, Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y tinción SYBR® Safe DNA gel stain (Life technologies, CA, EEUU) 2.5 µl/100 ml. El tamaño del amplicón salvaje de laforina es de 554-bp; el mutante, de 400-bp; el salvaje de malina, de 1.2 kb, y el mutante de malina, de 2.6 kb.

Nombre del oligonucleótido cebador	Secuencia
Laforina sentido	5'-GCCACAGTTCAAGAGAGGAAGG-3'
Laforina anti-sentido	5'-CATCAGAGGTAGGGGAGCAAC-3'
Ausencia de laforina sentido	5'-CAGTTTCATAGCCTGAAGAACG-3'
Ausencia de laforina anti-sentido	5'-TTCCTTAACTAAGCGTGAGGTC-3'
Malina sentido	5'-TGTCTTGAATGGAAGCACAGCCTTGA-3'
Malina anti-sentido	5'-ACTACCGTTACAGCTCCAGCTCTCGTTG-3'
Ausencia de malina sentido	5'-GAACCGCTGGCTCGAACTTACCTGT-3'
Ausencia de malina anti-sentido	5'-CATCTCCTGTTTCCTGGGGTCAATGA-3'

Tabla 1. Relación de los oligonucleótidos cebadores utilizados

2.Tratamientos

2.1. Tratamiento con 4-PBA

El 4-PBA se comporta como una chaperona química que puede revertir el mal plegamiento y la agregación de proteínas anómalas. Se realizaron tratamientos con 4-

PBA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) en el modelo *Epm2b*^{-/-} a los 3 meses de edad, a una dosis de 20mM en agua de biberón *ad libitum* durante 8 semanas (Berthier et al., 2015). Se establecieron 3 grupos de animales: ratones control sin tratamiento, *Epm2b*^{-/-} sin tratamiento y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de 4-PBA. Finalizado el tratamiento se llevó a cabo el estudio fenotípico en 16 ratones de cada grupo.

2.2. Tratamiento con metformina

La metformina es un fármaco extensamente utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La metformina activa la AMPK, enzima que a su vez puede impulsar la autofagia. Se llevaron a cabo tratamientos con metformina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) en el modelo *Epm2b*^{-/-} a los 3 meses de edad a una dosis de 12mM en agua de biberón *ad libitum* durante 8 semanas (Berthier et al., 2015). Se establecieron 3 grupos de animales: ratones control sin tratamiento, *Epm2b*^{-/-} sin tratamiento y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de metformina. Finalizado el tratamiento se llevó a cabo el estudio fenotípico en 16 ratones de cada grupo.

2.3. Tratamiento con selenato sódico

El selenato sódico es la sal sódica del selenio, un oligoelemento con múltiples propiedades. Se administró el selenato sódico (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) en los ratones *Epm2b*^{-/-} a una dosis de 1,2 mg/100 ml en agua de biberón *ad libitum* durante 4 y 10 semanas (van Eersel et al., 2010). Se establecieron 4 grupos de animales de 11 meses de edad: ratones control sin tratamiento, *Epm2b*^{-/-} sin tratamiento, *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico durante 4 semanas, y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico durante 10 semanas. Se llevó a cabo el tratamiento y posterior estudio fenotípico en 12-25 ratones de cada grupo dependiendo de cada experimento.

3. Estudios de comportamiento motor

Se realizaron diversos estudios de comportamiento motor para evaluar los efectos de los tratamientos con selenato sódico sobre las alteraciones de actividad motora, equilibrio y discinesias descritas en el ratón deficiente para la expresión de

malina. Se analizaron dichas alteraciones en el actímetro, el rotarod y mediante el test de suspensión de la cola.

3.1. Análisis de la actividad motora en el actímetro

Se evaluó la actividad locomotora espontánea y la actividad exploratoria de los ratones en un actímetro (PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU). Se contabilizó, a través del software Sedacom 1.4 (PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU), el movimiento acumulado de desplazamiento superficial, los alzamientos y los movimientos estereotipados a los 15, 30, 45 y 60 min (Garcia-Cabrero et al., 2012). También se utilizó otro software, el Actitrack 2.7.13 (PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU) que permite transformar la información obtenida de los sensores infrarrojos en datos sobre la trayectoria de los animales. Se establecieron dos zonas en la arena, la central y la de los laterales, y se analizó el porcentaje de tiempo que el ratón transcurrió en la zona central de la arena durante los 10 primeros minutos desde su posicionamiento en el actímetro.

3.2. Experimentos de coordinación motora y equilibrio en el rotarod

Los experimentos se realizaron en un rotarod LE8200 (PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU) según el procedimiento descrito en (Navarro et al., 2008, Garcia-Cabrero et al., 2012). Se realizaron cuatro entrenamientos en dos días consecutivos. Los tres primeros entrenamientos fueron con rotación de 4 rpm, y el cuarto con rotación de 8 rpm. En los dos días posteriores se analizaron los animales en dos sesiones cada día, programando el rotarod a una velocidad con aceleración constante de 4 a 40 rpm en 5 min, y se registró el tiempo que tardaban en caerse del rodillo (periodo de latencia).

3.3. Estudios de las alteraciones de postura y discinesias mediante el test de suspensión de la cola

El test de suspensión de la cola (*tail suspension test, TST*) se utiliza para medir alteraciones neurológicas en ratones (Reddy et al., 1998, Carter et al., 1999, Fernagut et al., 2002) y refleja signos de discinesias y ataxias (movimientos anormales) y posturas anormales de las extremidades posteriores. Para realizarlo se siguió el

procedimiento descrito en (Garcia-Cabrero et al., 2012). Se sostuvo al ratón por la mitad de la cola durante 15 seg y se le asignó un valor en función de la conducta: “0” si el animal extiende completamente las extremidades posteriores, “1” cuando el animal encoge intermitentemente una o las dos patas, o “2” si mantiene dobladas las patas traseras junto al abdomen.

4. Estudios de memoria mediante el test de reconocimiento de objetos

El test de reconocimiento de objetos (*object recognition task*, ORT) se utilizó para medir la memoria episódica o memoria a corto plazo después de los tratamientos con selenato sódico en el modelo *Epm2b*^{-/-}. El procedimiento utilizado se describe en (Garcia-Cabrero et al., 2012). Se colocó al animal en una caja vacía durante 10 min; transcurridas dos horas se colocó al animal en la caja con dos objetos iguales (A y B) y finalmente, dos horas después, se colocó al animal con un objeto ya conocido (A) y un objeto nuevo (C). Se registró el tiempo que el animal exploraba cada ficha (*tA* y *tC*). Con estos datos se calculó el índice de discriminación (ID), medida de la capacidad del animal para diferenciar un objeto nuevo de uno conocido. Se trata de la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo (*tC*) y del objeto familiar (*tA*) con respecto al tiempo total de exploración ($tT = tA + tC$) empleándose la siguiente fórmula: $ID = tC - tA / tT$.

5. Análisis de vídeo-EEG

Se analizó el vídeo-EEG en ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Los registros de vídeo-EEG se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito en (Garcia-Cabrero et al., 2012). Se utilizaron cuatro electrodos epidurales que se elaboraron en el laboratorio, como se describe a continuación y se implantaron intracranealmente en los animales previamente anestesiados. Finalmente, tras 2-3 días de recuperación de la operación, los animales se registraron en un equipo de vídeo-EEG.

5.1. Elaboración de los electrodos

Los electrodos constan de un cable de cobre de 9-10 mm de longitud biológicamente inerte (Avisor S.A.; Barcelona, España), un conector en un extremo (Plastics One, Roanoke, VA, EEUU) y un tornillo de joyería de acero inoxidable 316 L, de dimensiones 1,55 x 1,55 x 0,90 mm (diámetro x longitud x rosca) (IsoSwiss, Boecourt, Suiza) en el otro extremo (Fig. 2). Se soldaron cada una de las partes entre sí con estaño (super solder wire, Golden Solder, Taiwan) y se comprobó la continuidad entre ambos extremos con un ohmnimé tro (SilverElectronics, Barcelona, España).

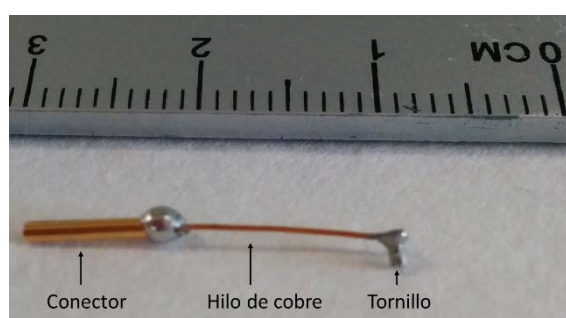


Figura 2. Ejemplo de un electrodo en el que se observa el conector, el hilo de cobre y el tornillo.

5.2. Implantación de los electrodos intracraneales en ratones

Para proceder a la implantación intracraneal de los electrodos, se anestesió a los animales con una inyección intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina (Ketolar, Pfizer, Espoo, Finlandia)/medetomidina (Domtor, Pfizer, Espoo, Finlandia) a una dosis de 75/1 mg/kg. Se les rasuró el pelo de la cabeza y se inmovilizó a cada animal en posición *decúbito prono* utilizando un fijador Cunningham (Stoelting, IL, EEUU) y se realizó una incisión siguiendo el plano sagital del cráneo separando la piel del mismo. A continuación, se realizaron en el cráneo de los ratones cuatro orificios de aproximadamente 0.9 mm de diámetro con una micro-fresa (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Alemania) y se atornillaron los electrodos intracranealmente. Se colocaron dos electrodos registradores delante de la línea de Bregma, y un electrodo de referencia y uno de masa o tierra detrás de la línea de Lambda (Fig. 3). A continuación, se acopló un zócalo (Plastics One, Roanoke, VA, EEUU) para agrupar los conectores y finalmente, todo ello se fijó al cráneo con una resina dental auto-polimerizable (Selectaplug CN, Dentsply DeTrey GmbH, Dreieich, Alemania). Después

de la operación, se inyectó a los animales de forma subcutánea 1 ml de NaCl al 0.9% (BRAUN Medical S.A., Rubí, Barcelona, España) para rehidratarlos y 0,5 mg/kg Antisedan (Pfizer, Espoo, Finlandia) como contra-anestesia.

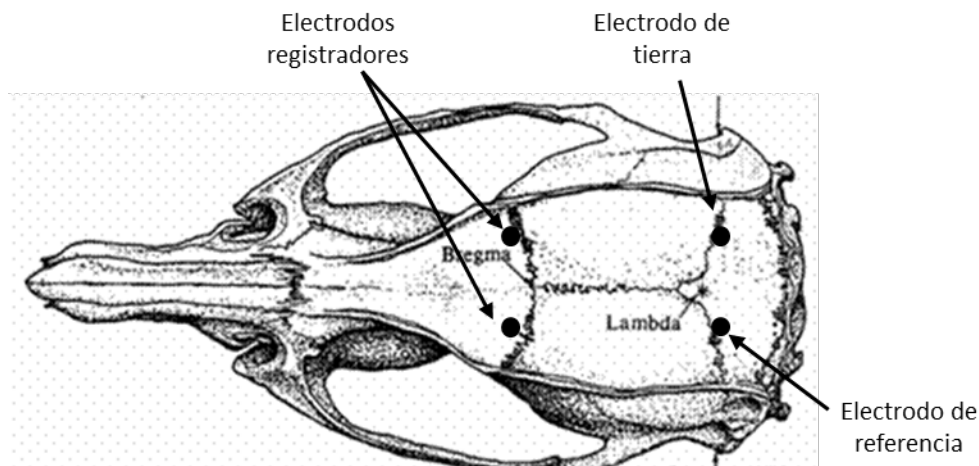


Figura 3. Posición equivalente de los electrodos en el cráneo de rata. Se posicionan dos electrodos registradores por delante de la línea de bregma y el electrodo de referencia y el de tierra por detrás de la línea de lambda. Imagen adaptada de *George Paxinos and Charles Watson: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York, 1998, p. 11.*

5.3. Registro de vídeo-EEG

Transcurridos dos días desde la operación para la correcta fijación de los electrodos, se procedió a la realización del registro monopolar de vídeo-EEG durante 48 horas, usando un equipo Natus Neurowork EEG (Natus Medical Inc., San Carlos, CA. EEUU). Los registros se realizaron usando 100 Hz de filtro de paso alto, 0.5 Hz de filtro de paso bajo y una sensibilidad de 30 $\mu\text{V}/\text{mm}$. El equipo lleva acoplada una cámara de video (Sony Handycam DCR-SX34, Tokio, Japón) que permite que el registro de EEG y la grabación del animal se realice en tiempo real.

5.4. Administración de PTZ

El PTZ (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) se inyectó disuelto en agua estéril i.p. en una única dosis a diferentes concentraciones: 30 mg/kg, dosis subconvulsiva (Erakovic et al., 2001) y 50 mg/kg, dosis convulsiva (Erakovic et al., 2001, Keskil et al., 2001, Eloqayli et al., 2003). Tras la inyección del fármaco se contabilizaron

el número de mioclonías y de crisis generalizadas tónico-clónicas, así como el tiempo de latencia hasta la aparición de las dichas crisis y la duración de las mismas.

6. Ecocardiografía

Se realizó un estudio ecocardiográfico ciego (Vevo 2100, VisualSonic, Toronto, Canadá) de los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} y de los ratones control en un grupo de 8 a 10 meses de edad y otro grupo de 14 a 16 meses de edad. Este estudio se llevó a cabo en el CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) siguiendo procedimientos previamente descritos (Ram et al., 2011, Lopez-Olaneta et al., 2014). Los animales permanecieron anestesiados con isoflurano y emplazados en una placa térmica ajustada a 38.3°C para mantener la temperatura corporal en condiciones fisiológicas. La anestesia se administró con oxígeno al 100% a través de una mascarilla nasal y utilizando inicialmente una concentración de isoflurano del 2% para la inducción y del 1.5% para el mantenimiento. La frecuencia cardíaca (FC) se monitorizó a través de 4 electrodos conectados a la placa térmica y la concentración de isoflurano administrado se ajustó con el objetivo de mantener la FC en 450-550 latidos por minuto para mantener al ratón en un plano anestésico superficial.

Se adquirieron y grabaron imágenes con una sonda de 30 MHz del eje paraesternal largo y paraesternal corto, tanto en modo bidimensional (2D) como en modo M (MM), para la obtención del grosor de la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo, de la dimensión del ventrículo izquierdo, de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y de la masa cardíaca. Posteriormente se realizó el análisis de las imágenes de forma ciega utilizando la estación de trabajo del equipo (Vevo 2100 analysis software, VisualSonic, Toronto, Canadá).

7. Análisis histopatológicos

7.1. Disección y preparación de las muestras

Para la evaluación de la presencia de la proteína tau hiperfosforilada, se utilizaron muestras de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer como controles positivos, muestras que fueron amablemente cedidas por los Drs. Alberto

Rábano y Jose Ramon Fortes. Se analizaron cerebros de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} antes y después de los distintos tratamientos. Para la evaluación de los efectos del selenato sódico se analizaron los cerebros de los ratones control, *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamientos de selenato sódico a 4 y 10 semanas. En ambos estudios los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Ketolar, Pfizer, Espoo, Finlandia) / medetomidina (Domtor, Pfizer, Espoo, Finlandia) a una dosis de 75/1 mg/kg i.p. Posteriormente, se perfundieron mediante punción cardiaca intraventricular con paraformaldehído al 4% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España) en tampón fosfato 0.2 M pH 7.2. Una vez finalizada la perfusión, se procedió a la extracción del cerebro, que se mantuvo en solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C.

En el estudio del miocardio, se analizaron los corazones de los ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} del grupo de 14 a 16 meses de edad. Para la obtención de las muestras, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂, se extrajeron los corazones y se tomaron medidas de la longitud de la tibia y del peso del corazón de cada animal. Posteriormente se lavaron 3 minutos en una solución de KCl a una concentración 1M para detener los corazones en diástole y se mantuvieron en solución de paraformaldehído al 4% durante 48 horas a 4°C.

7.2. Fijación e inclusión en parafina

Tras la fijación, el cerebro se cortó en secciones coronales de 3-4 mm de grosor, que fueron incluidas en parafina utilizando un incluidor Leica TP 1020 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). En el caso de los corazones, las muestras fueron incluidas directamente sin diseccionar. En el incluidor se sumergió la cubeta con las cápsulas que contenían las muestras en alcohol al 70% (2 h) y después en agua destilada (2 h). A continuación, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de disoluciones de etanol, 3 veces en etanol al 96% y 2 en etanol al 100% (30 min cada uno), y una vez más en etanol al 100% (1 h). Seguidamente, se pasaron por dos recipientes con xilol (45 min cada uno) y para finalizar, por dos recipientes más con parafina (45 min cada uno). Una vez acabado el proceso de inclusión, se procedió a la elaboración de los bloques de parafina con las muestras.

7.3. Cortes histológicos

Se realizaron cortes seriados de los bloques de cerebro de 3 μm de grosor siguiendo el plano coronal, y cortes seriados de los corazones con 4 μm de grosor en un microtomo (Microm GmbH, Walldorf, Alemania). Los cortes se montaron en portaobjetos SuperFrost® Plus (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Alemania), y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior uso en inmunohistoquímica y otras tinciones histológicas.

7.4. Tinción del ácido periódico de Schiff, PAS

La reacción de PAS revela todo tipo de carbohidratos (glucógeno, mucopolisacáridos, glucolípidos, glucoproteínas etc.) en secciones histológicas. Se basa en la rotura de los enlaces -C-C- presentes en los hidratos de carbono por la acción del ácido periódico, potente agente oxidante, liberándose grupos aldehído que al combinarse con el reactivo de Schiff dan un compuesto de color rojo púrpura intenso.

La tinción de PAS (Dako Diagnósticos S.A., Sant Just Desvern, Barcelona, España) de las muestras de cerebro fue realizada en el Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz, y la tinción de las muestras de corazón se realizó en el CNIC. Brevemente, los cortes se desparafinaron en xilol, se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente (100%, 95% y 70%, durante 5 min en cada uno de ellos) y se incubaron con la solución de *Alsacian Blue* al 0.5% en ácido acético 3%, pH 2.5 durante 1 min. A continuación, se trataron con ácido periódico al 0.5% durante 10 min y se lavaron con agua del grifo durante 10 min. Seguidamente, se incubaron con el reactivo de Schiff durante 20 min, se lavaron con agua corriente durante 15 min y se contrastaron con Hematoxilina de Carazzi al 0.1% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España). Por último, se lavaron durante 5 min, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y en xilol, y se finalizó el montaje con Depex (Serva GmbH, Heidelberg, Alemania).

7.5. Inmunohistoquímica

Las secciones, previamente desparafinadas, fueron rehidratadas por inmersión en xilol y en una serie de alcoholes de graduación decreciente. Para el

desenmascaramiento de epítomos, las secciones fueron incubadas con una solución 0,1 M a pH 6,0 de tampón citrato, previamente hervida durante 10 min. Se continuó con el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 2% en metanol durante 20 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) a una concentración 0,1 M y pH 7,4. Después, las secciones se incubaron con tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino, BSA, al 1%, suero fetal bovino, FBS, al 5%, Tritón X-100 al 2% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave (35 rpm) para, posteriormente, dejarlas incubando durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-NeuN (*neuronal nuclei*) (concentración 1:500), anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (concentración 1:1.000) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) y el anticuerpo AT8, que reconoce un epítomo de tau hiperfosforilado en Ser202/Thr205 (Concentración 1:200) (Thermo Scientific-Pierce, Waltham, MA, USA). A continuación, se realizaron 4 lavados con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, concentración 1:250) en tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave (35 rpm). Después de 3 lavados con PBS las secciones se tiñeron con el kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), se lavaron 3 veces con PBS y seguidamente se incubaron 1 min con diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA, EEUU) y se lavaron con agua durante 1 min. Posteriormente, se contrastaron con Hematoxilina de Carazzi al 0.1% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España) durante 5 min y se retiraron los restos con agua. Por último, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y en xilol y se finalizó el montaje con Depex (Serva GmbH, Heidelberg, Alemania).

7.6. Microscopia óptica

Para la visualización de las muestras, se empleó un microscopio Leica DM LB1 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas y capturadas mediante una cámara digital Leica DFC 320 acoplada al microscopio y procesadas utilizando el programa informático Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA).

8. Análisis estadístico

Los datos de los estudios de actividad y coordinación motora, el estudio de la memoria episódica, los estudios ecocardiográficos, los datos obtenidos tras la cuantificación de las secciones de inmunohistoquímica, así como la duración de las crisis inducidas por PTZ y el tiempo de latencia desde la inyección de dicho agente, se muestran en los resultados como la media \pm el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). Estos datos fueron analizados por one-way ANOVA seguido del test de la t de student para ver las diferencias entre grupos. Por otro lado, el porcentaje de animales con posturas anormales, el porcentaje de animales que presentaron mioclonías y crisis generalizadas tónico-clónicas en respuesta a PTZ, así como el porcentaje de animales sobre los que este agente tuvo efectos letales, fueron analizados mediante el test del Chi-cuadrado. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$ ### $p < 0.001$.

RESULTADOS

1. Estudios de excitabilidad neuronal mediante la administración de PTZ en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora

En primer lugar se realizaron estudios del fenotipo epiléptico en dos modelos animales de la enfermedad de Lafora, el ratón *Epm2a*^{-/-} (Ganesh et al., 2002a), y el *Epm2b*^{-/-} (Criado et al., 2012). Estos estudios estaban dirigidos a mejorar la caracterización de sus fenotipos para poder evaluar con mayor exactitud los efectos de los distintos tratamientos que se querían ensayar con el fin último de trasladar su uso a los pacientes con la enfermedad.

1.1. Patrón de crisis inducidas por PTZ en ratones de 16 meses

Para profundizar en el estudio de la actividad epiléptica de estos ratones, se realizaron registros de vídeo-EEG en ratones control y en ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de 16 meses de edad tras la inyección de PTZ, y se analizaron los patrones de las mismas (Fig. 4).

En ambos modelos de enfermedad de Lafora se observó que la inyección de PTZ a dosis convulsivas produce una primera fase consistente en periodos de inmovilidad, espasmos e hiperextensión de las extremidades que progresan hasta la aparición de una segunda fase de crisis generalizada tónico-clónica propiamente dicha, al igual que ocurre en los ratones control. Sin embargo, los registros de vídeo-EEG intracraneales mostraron patrones de descargas específicos en cada modelo.

En el caso de los ratones *Epm2a*^{-/-}, la fase inicial aparece antes que en los ratones control y tiene una duración menor. En el EEG se observan puntas y complejos punta-onda arrítmicos, mientras que en los ratones control las puntas y los complejos punta-onda son rítmicos. La segunda fase de crisis generalizada tónico-clónica en los ratones *Epm2a*^{-/-} tiene una duración ligeramente mayor que en el caso de los ratones control y consiste en una fase tónica, seguida de una fase clónica y finalmente otra fase tónica mientras que en los ratones control se observa una fase tónica seguida de una fase clónica. En el EEG no se observan diferencias en esta segunda fase, aunque en

el modelo *Epm2a*^{-/-} hay un periodo final sin actividad neuronal de mayor duración que en los ratones control (Fig. 4A, B).

En los ratones *Epm2b*^{-/-}, la fase inicial también comienza antes que en los ratones control, aunque su duración es algo mayor que en los ratones *Epm2a*^{-/-}. En el EEG no se observan diferencias. La segunda fase de crisis generalizada tónico-clónica tiene una duración similar a las observadas en los ratones control y al igual que en estos ratones consiste en una fase tónica seguida de una fase clónica. Tampoco se observan diferencias en el EEG y, como en los ratones control, el periodo final sin actividad neuronal casi no se apreció en este modelo (Fig. 4A, C).

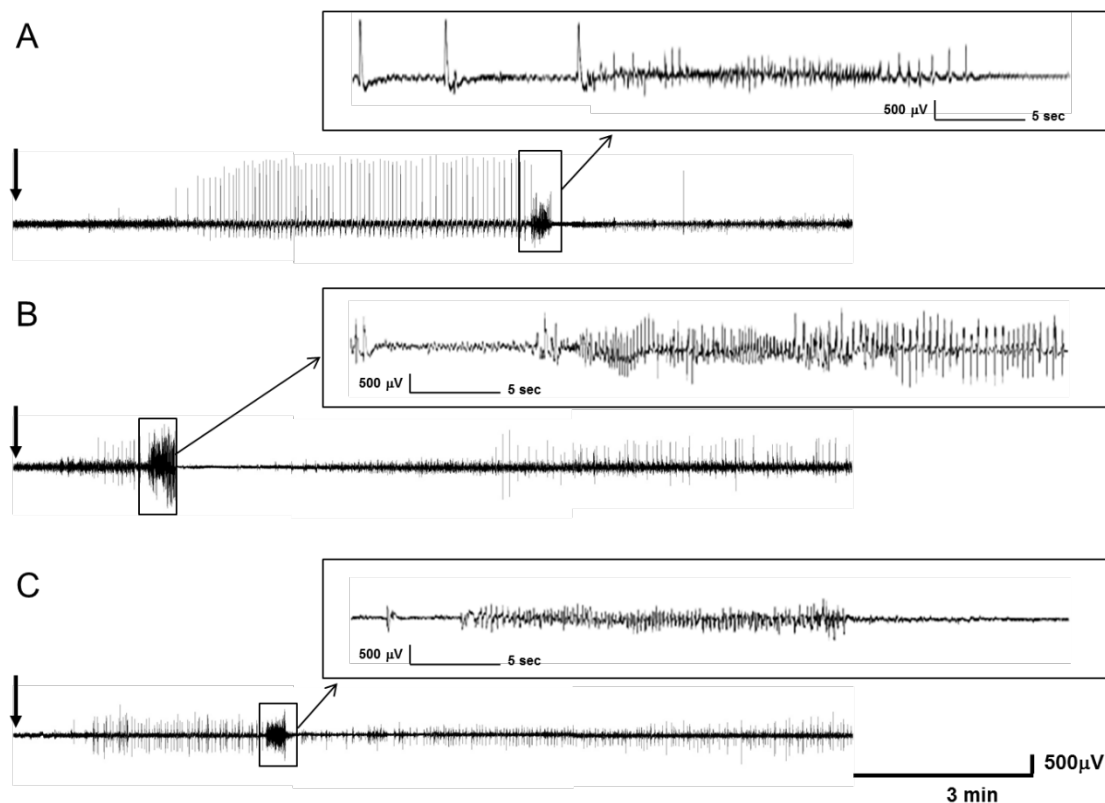


Figura 4. Registros de EEG representativos de ratones control (A), *Epm2a*^{-/-} (B) y *Epm2b*^{-/-} (C) de 16 meses de edad tras la administración i.p. de 50 mg/ kg de PTZ (flechas). Se muestran fragmentos de 10 minutos desde la inyección (flecha), en los que se observa un periodo inicial seguido de la crisis generalizada tónico-clónica propiamente dicha. Además, se muestran imágenes ampliadas de 30 segundos que incluyen la crisis generalizada tónico-clónica.

1.2. Sensibilidad de estos modelos a la administración de PTZ en edades tempranas

Se ha descrito la presencia de muerte neuronal en ratones *Epm2a*^{-/-} a los 11 días de edad (Machado-Salas et al., 2012). Por ello, una vez realizado el estudio de la sensibilidad a PTZ en los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} en edades adultas (García-Cabrero et al., 2014), se decidió evaluar esta sensibilidad en edades más tempranas.

Así, se inyectaron dosis de 50 mg/kg de PTZ en ratones control y en ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} a los 15 días de edad. Se evaluó el porcentaje de animales que mostraron mioclonías (Fig. 5A), el porcentaje de animales que presentaron crisis generalizadas tónico-clónicas (Fig. 5B) y el porcentaje de letalidad (Fig. 5C) en respuesta a la inyección de dosis convulsivas de PTZ. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

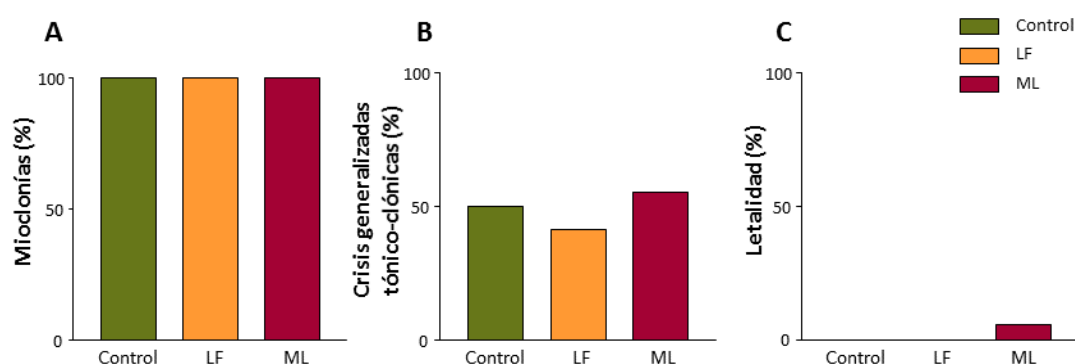


Figura 5. Sensibilidad de los ratones control y los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con 15 días de edad a la administración de 50 mg/kg de PTZ. El porcentaje de ratones que presentan mioclonías (A), el porcentaje de animales con crisis generalizadas tónico-clónicas (B) y letalidad (C) producida por PTZ no muestran diferencias entre grupos. Los datos se muestran como porcentajes y fueron analizados por el test del Chi-cuadrado (n=16). LF: ratón *Epm2a*^{-/-}; ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

A continuación, se realizó el mismo análisis con dosis convulsivas de PTZ a ratones control y a ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de un mes de edad. Igual que en los ratones de 15 días de edad, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ni en el número de animales que mostraron mioclonías (Fig. 6A), ni en el que presentaron crisis generalizadas tónico-clónicas (Fig. 6B), ni en la letalidad inducida por PTZ (Fig. 6C).

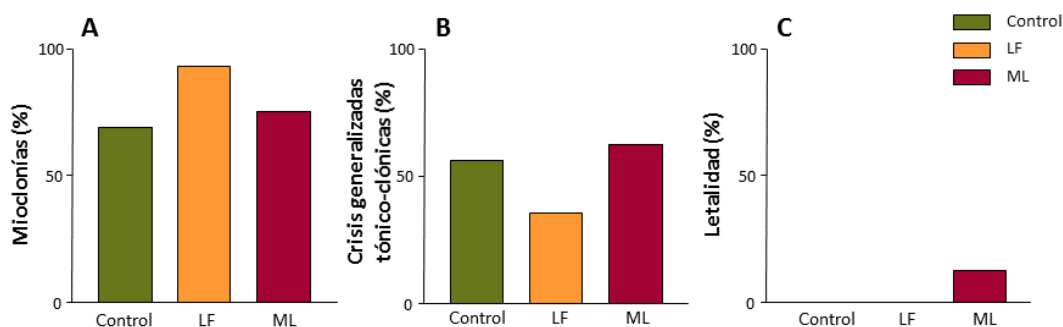


Figura 6. Sensibilidad de los ratones control, *Epm2a^{-/-}* y *Epm2b^{-/-}* con un mes de edad a la administración de PTZ a dosis de 50 mg/kg. El porcentaje de animales que presentaban mioclonías (A), el porcentaje con crisis generalizadas tónico-clónicas (B) y el porcentaje de letalidad en estos ratones (C) producida por PTZ no muestran diferencias significativas entre grupos. Los datos se muestran como porcentajes y fueron analizados por el test del Chi-cuadrado ($n=16$). LF: ratón *Epm2a^{-/-}*; ML: ratón *Epm2b^{-/-}*.

2. Ensayos de nuevos agentes farmacológicos para el tratamiento de la enfermedad de Lafora

Se llevaron a cabo tratamientos en el modelo *Epm2b^{-/-}* con 4-PBA y metformina para analizar los cambios producidos en la sensibilidad de los ratones a un agente epileptógeno, y con selenato sódico, todo ello con el fin de continuar la búsqueda de nuevas terapias que puedan mejorar el estado de los pacientes con dicha enfermedad.

2.1. Tratamiento con 4-PBA

El 4-PBA se comporta como una chaperona química que puede revertir el mal plegamiento y la agregación de proteínas anómalas. Se trató a los ratones *Epm2b^{-/-}* con 4-PBA durante 8 semanas y se realizó el estudio del fenotipo epiléptico a los 4 meses de edad.

2.1.1. Efectos del 4-PBA sobre la sensibilidad del modelo *Epm2b^{-/-}* a presentar crisis generalizadas tónico-clónicas inducidas por PTZ

Se administró PTZ a dosis convulsivas (50 mg/kg) en ratones control, ratones *Epm2b^{-/-}*, y ratones *Epm2b^{-/-}* tratados con 4-PBA para valorar el efecto de dicho tratamiento sobre la hiperexcitabilidad y las crisis epilépticas que presentan estos ratones. El PTZ produce crisis generalizadas tónico-clónicas en un 50 % de los ratones control, mientras que el porcentaje se eleva en los ratones *Epm2b^{-/-}* (78%) (Fig. 7A)

(Garcia-Cabrero et al., 2014). Tras el tratamiento con 4-PBA, se observó un notable descenso en el porcentaje de animales que presentaban crisis generalizadas tónico-clónicas (37,5%) (Fig. 7A). Además, a pesar de que las diferencias no son estadísticamente significativas, el porcentaje de ratones que presentaban letalidad mostró una tendencia a disminuir tanto en los ratones *Epm2b*^{-/-} (17%) como en los ratones *Epm2b*^{-/-} tratados con 4-PBA (6.25%), en comparación con los ratones control (37%) (Fig. 7B).

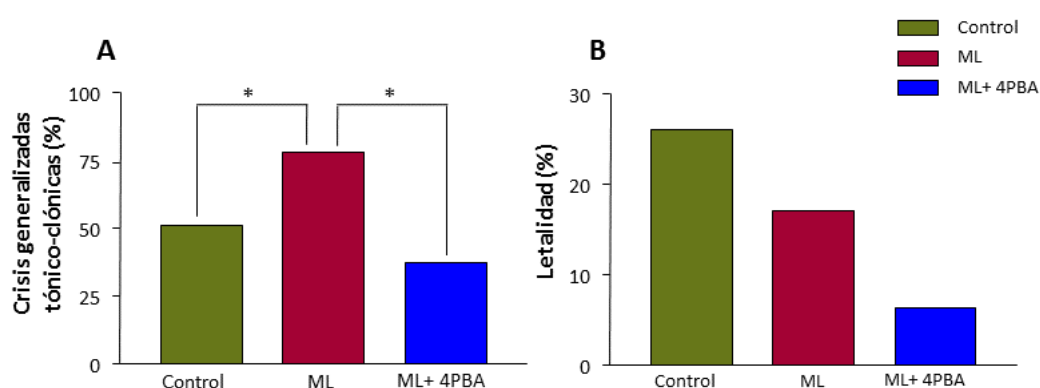


Figura 7. Sensibilidad del ratón *Epm2b*^{-/-} a PTZ después del tratamiento con 4-PBA. El porcentaje de animales con crisis generalizadas tónico-clónicas en respuesta a la inyección de 50 mg/kg de PTZ disminuye tras el tratamiento con 4-PBA (A). También desciende la letalidad producida por PTZ (B). Los datos se muestran como porcentajes y se analizaron mediante el test del Chi-cuadrado. *p < 0.05 (n = 16). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

2.1.2. Tiempo de latencia y duración de las crisis inducidas por PTZ

El tiempo de latencia, o tiempo transcurrido entre la inyección de PTZ y la aparición de la crisis generalizada tónico-clónica, se ve reducido en los ratones *Epm2b*^{-/-} (Fig. 8A). También se observan diferencias en la duración de las crisis, que fueron más largas en ratones *Epm2b*^{-/-} (Fig. 8B) (Garcia-Cabrero et al., 2014). El tratamiento con 4-PBA redujo las diferencias presentes entre ratones control y ratones *Epm2b*^{-/-} tanto en el tiempo de latencia (Fig. 8A) como en la duración de las crisis (Fig. 8B).

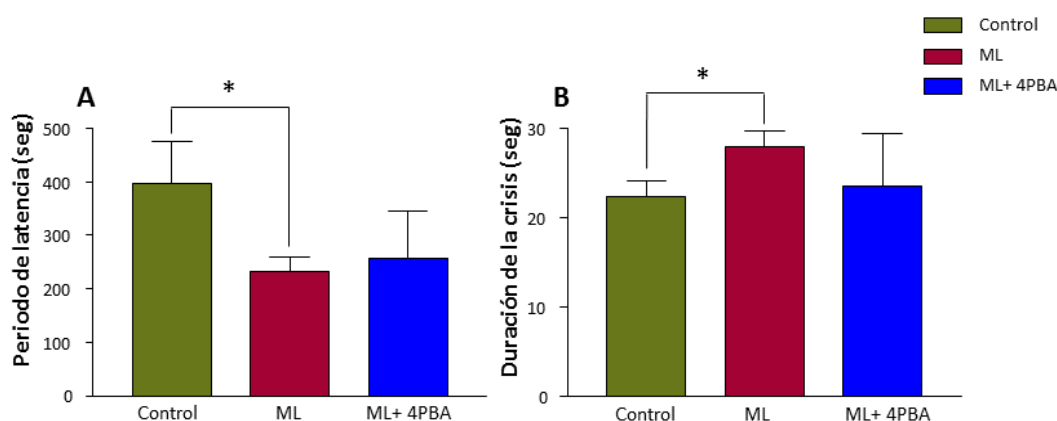


Figura 8. Sensibilidad del ratón *Epm2b*^{-/-} a PTZ después del tratamiento con 4-PBA. Las diferencias en tiempo de latencia (A) y duración de la crisis (B) desaparecen con el tratamiento. Los datos se muestran como la media \pm SEM y se analizaron por One-way ANOVA. * $p < 0.05$. ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

2.2. Tratamiento con metformina

La metformina actúa como un agente neuroprotector en diversas enfermedades. Tras realizar un tratamiento con metformina en ratones *Epm2b*^{-/-} durante 8 semanas, se analizó su efecto sobre la respuesta a PTZ.

2.2.1. Efectos de la metformina sobre la sensibilidad del modelo *Epm2b*^{-/-} a presentar crisis generalizadas tónico-clónicas inducidas por PTZ

Se administró PTZ a dosis convulsivas (50 mg/kg) en ratones tratados con metformina para valorar el efecto del tratamiento sobre la hiperexcitabilidad y la susceptibilidad a presentar crisis epilépticas. Como ya se ha mencionado anteriormente, el PTZ produce crisis generalizadas tónico-clónicas en un porcentaje elevado de ratones *Epm2b*^{-/-} (78%) (Fig. 9A) (García-Cabrero et al., 2014). Se observó un notable descenso en el porcentaje de ratones con crisis generalizadas tónico-clónicas tras el tratamiento con metformina (12,5%), presentando valores incluso por debajo de los observados en ratones control (50%) (Fig. 9A). El porcentaje de letalidad mostró una tendencia a disminuir en los ratones *Epm2b*^{-/-} (17%) en comparación con los ratones control (37%), y esta letalidad de PTZ a dosis convulsivas desapareció en los ratones tratados con metformina (Fig. 9B).

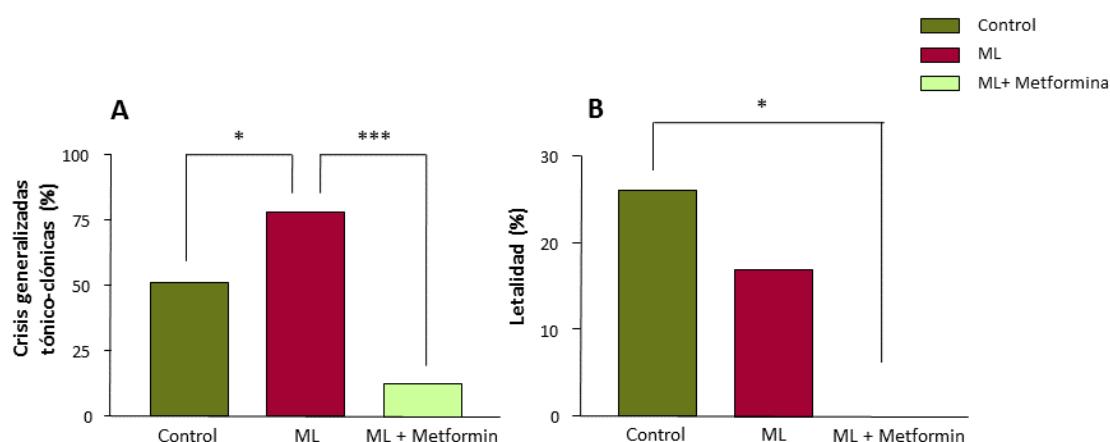


Figura 9. Sensibilidad del ratón *Epm2b*^{-/-} a PTZ después del tratamiento con metformina. El porcentaje de animales que presentan crisis generalizadas tónico-clónicas en respuesta a la inyección de 50 mg/kg de PTZ disminuye tras el tratamiento con metformina (A). La letalidad producida por PTZ desaparece en los ratones tratados (B). Los datos se muestran como porcentajes y fueron analizados por el test del Chi-cuadrado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ ($n=16$). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

2.2.2. Tiempo de latencia y duración de las crisis inducidas por PTZ

El tratamiento con metformina también eliminó las diferencias presentes entre ratones control y *Epm2b*^{-/-} en el tiempo de latencia (Fig. 10A). La duración de las crisis también mostró un descenso estadísticamente significativo en los ratones tratados (Fig. 10B). Así, la metformina reduce las diferencias presentes entre ratones control y ratones *Epm2b*^{-/-}, tanto en el periodo de latencia como en la duración de las crisis inducidas por PTZ.

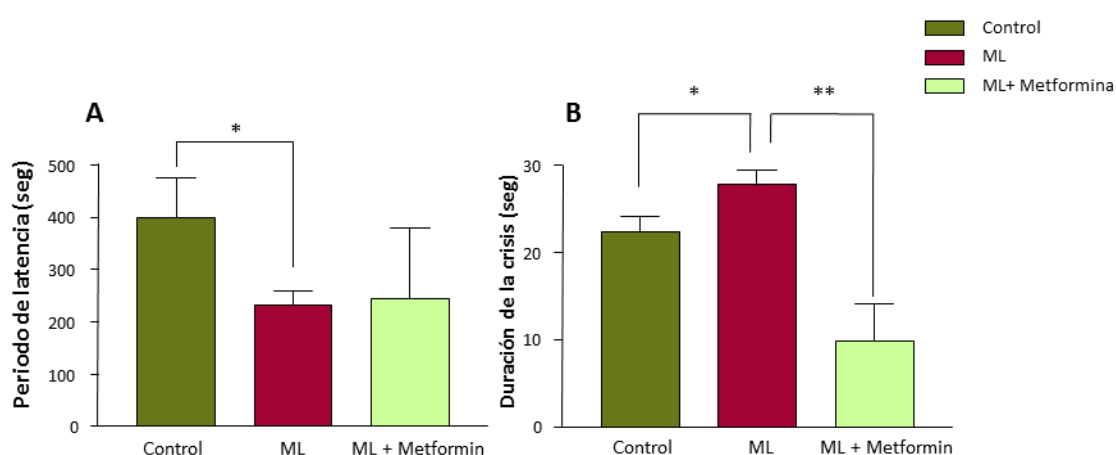


Figura 10. Sensibilidad del ratón *Epm2b*^{-/-} a PTZ después del tratamiento con metformina. Las diferencias entre los ratones control y *Epm2b*^{-/-} en el tiempo de latencia desaparecen con el tratamiento (A). La metformina reduce significativamente la duración de las crisis (B). Los datos se muestran como la media \pm SEM y se analizaron por One-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

2.3. Tratamientos con selenato sódico

Se realizaron tratamientos con selenato sódico, una forma oxidada del selenio, que posee una potente capacidad antioxidante. Se trataron ratones *Epm2b*^{-/-} durante 4 y 10 semanas y se evaluaron las diferencias fenotípicas con respecto a ratones control y a ratones *Epm2b*^{-/-} no tratados.

2.3.1. Estudios de las alteraciones de la actividad motora

En primer lugar, se realizaron análisis de la actividad motora espontánea en el actímetro. Se analizó el movimiento de desplazamiento acumulado (Fig. 11A), los movimientos de alzamiento (Fig. 11B), y los movimientos estereotipados (Fig. 11C). Los ratones *Epm2b*^{-/-}, tal y como se había descrito previamente (Garcia-Cabrero et al., 2012) presentan una menor actividad motora, tanto de desplazamiento, como de alzamiento y de movimientos estereotipados con respecto a los ratones control. El tratamiento con selenato sódico durante 4 semanas, no produjo ningún efecto en la actividad espontánea de estos ratones, y el tratamiento durante 10 semanas o bien no tuvo ningún efecto, o bien resultó en una actividad incluso menor que la de ratones *Epm2b*^{-/-} no tratados.

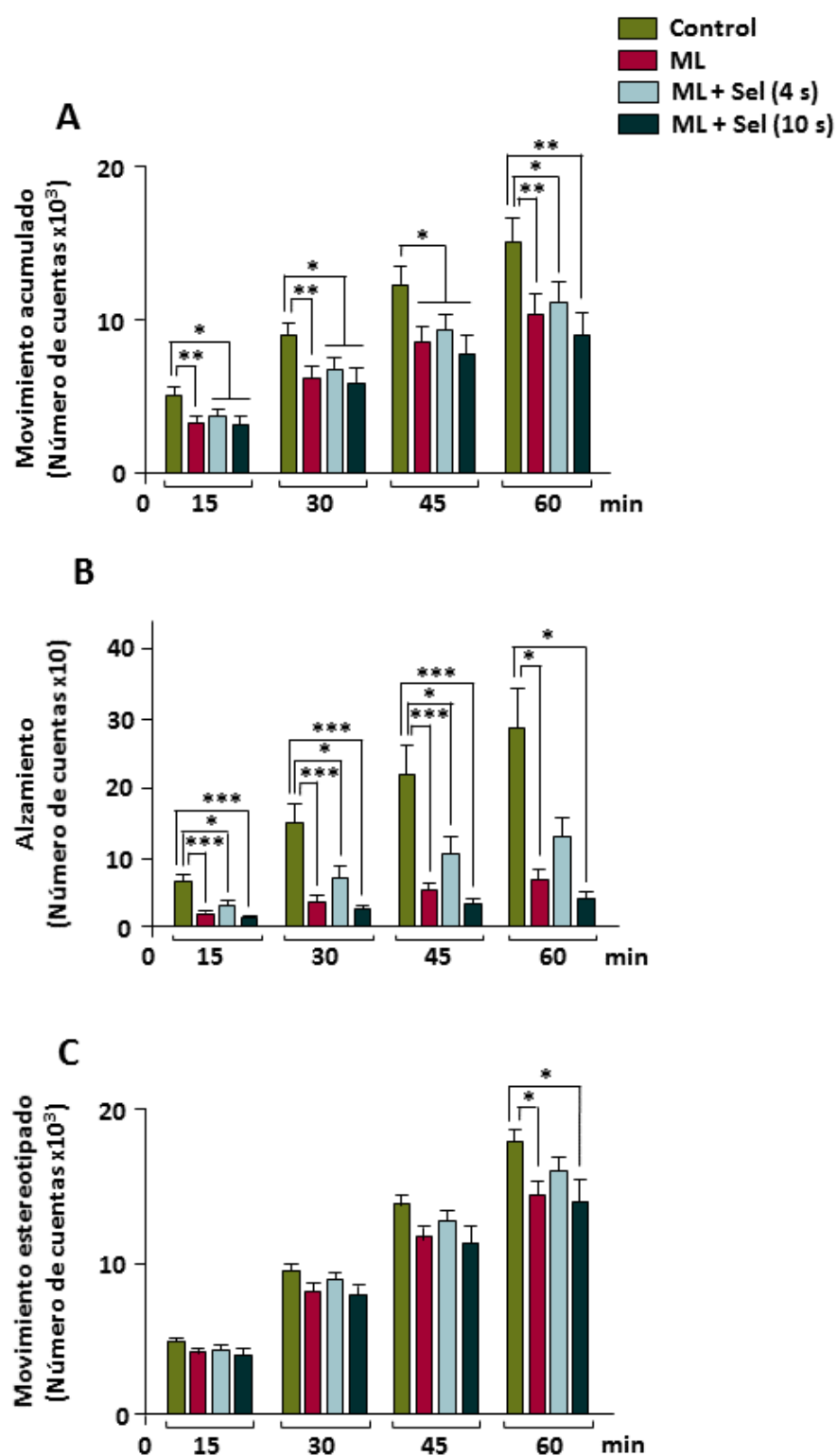


Figura 11. Actividad motora espontánea de los ratones control y los ratones *Epm2b*^{-/-} en presencia y ausencia de tratamiento con selenato sódico. Cuantificaciones de movimiento acumulado (A), movimientos de alzamiento (B) y movimientos estereotipados (C). No se observa mejoría en el movimiento espontáneo tras los tratamientos con selenato sódico. Los datos se muestran como la media \pm SEM (A, B, C). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ ($n = 12-25$). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

También en el actímetro, se analizó el porcentaje de tiempo que permanecieron los animales en la zona central de la arena durante los 10 primeros minutos desde su colocación en el aparato para evaluar la ansiedad de estos animales. No se disponía de datos sobre este comportamiento en ningún modelo de enfermedad de Lafora, por lo que se llevó a cabo este análisis tanto en el modelo *Epm2a*^{-/-} como en el modelo *Epm2b*^{-/-}. En este último además se realizó el análisis después de los tratamientos con selenato sódico. Se pudo observar que, tanto los ratones *Epm2a*^{-/-}, como los ratones *Epm2b*^{-/-}, permanecieron menos tiempo en la zona central de la arena que los ratones control (Fig. 12). Este comportamiento es indicativo de un estado de ansiedad en estos ratones.

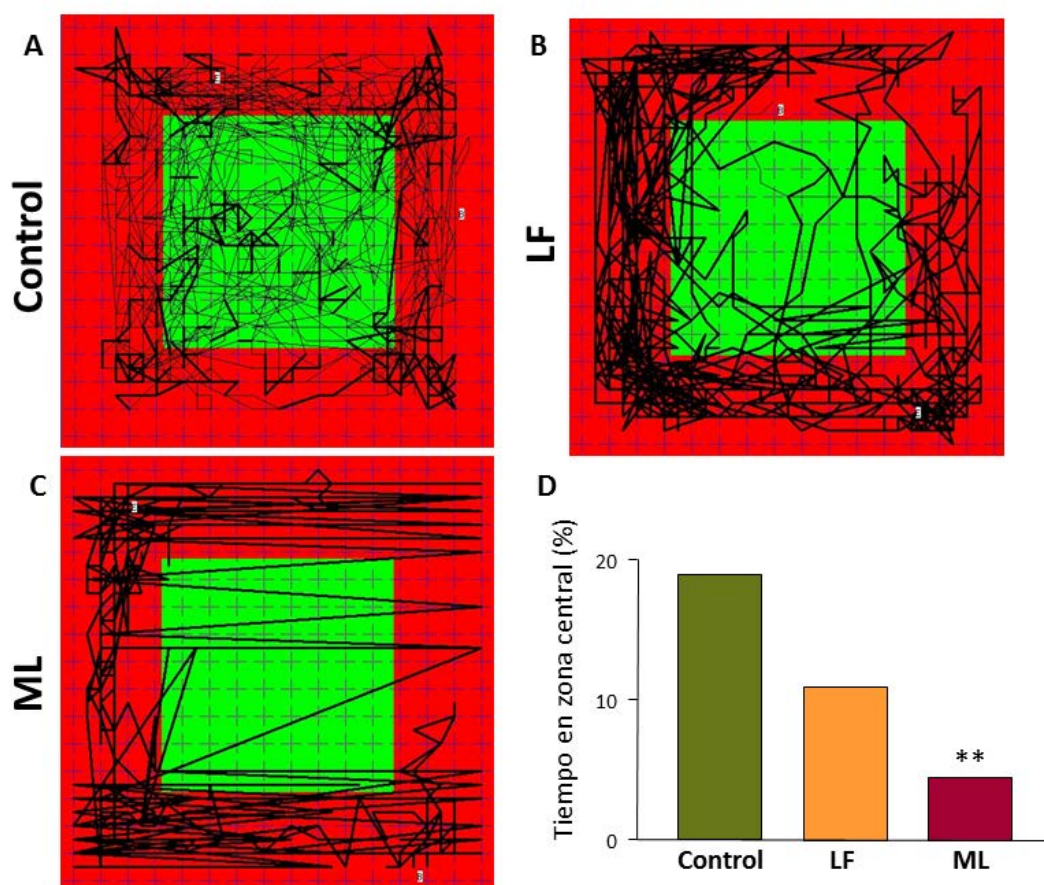


Figura 12. Trayectoria de los ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} en la arena del actímetro durante los 10 primeros minutos desde su posicionamiento (A-C). El porcentaje de tiempo que permanecen los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} en la zona central de la arena durante los 10 primeros minutos es menor que en los ratones control (D). Los datos se muestran como la media \pm SEM **p < 0.01 (n=12). LF: ratón *Epm2a*^{-/-}; ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

El tratamiento con selenato sódico durante 4 semanas en los ratones *Epm2b*^{-/-} disminuyó las diferencias con respecto a los ratones control, ya que los animales tratados permanecieron un mayor porcentaje de tiempo en la zona central de la arena. Tras el tratamiento con selenato sódico durante 10 semanas, los ratones tratados transcurrieron el mismo tiempo en la arena que los ratones *Epm2b*^{-/-} sin tratamiento (Fig. 13). Una vez más, parece que el tratamiento de larga duración no presenta efectos positivos sobre el estado de ansiedad de estos ratones.

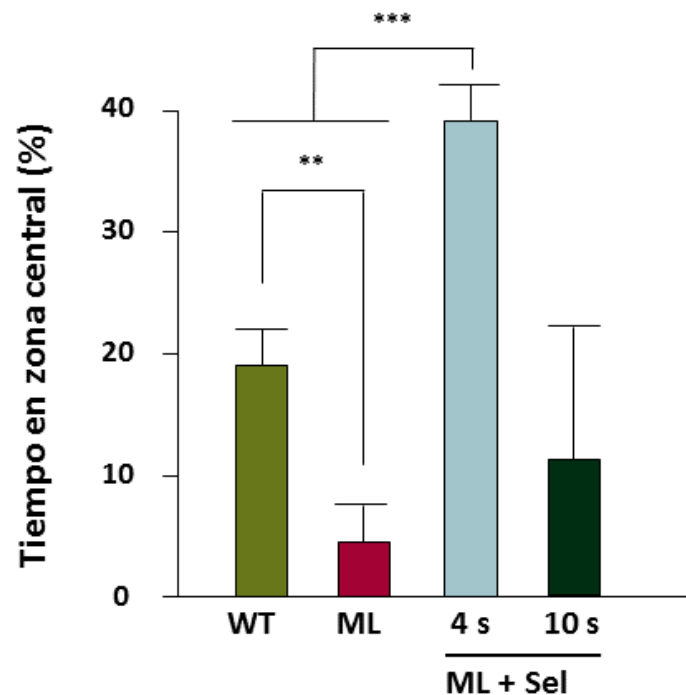


Figura 13. Porcentaje de tiempo de permanencia en la zona central de la arena durante los 10 primeros minutos en los ratones control, *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico durante 4 y 10 semanas. El selenato sódico mejora la ansiedad de los ratones *Epm2b*^{-/-}. Los datos se muestran como la media \pm SEM ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$. (n = 12-25). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.2. Análisis de las alteraciones de la coordinación motora y del equilibrio

Para continuar con el análisis del comportamiento motor, se evaluó la coordinación motora y el equilibrio de los ratones *Epm2b*^{-/-} tras el tratamiento con selenato sódico utilizando el rotarod. En primer lugar, se comprobó que el modelo *Epm2b*^{-/-} presenta un tiempo medio de latencia, o tiempo que tarda en caer desde que se posiciona en el rodillo, significativamente menor que los ratones control (García-Cabrero et al., 2012). Tras 4 semanas de tratamiento con selenato sódico, se observó

una ligera mejoría, con un mayor tiempo de latencia. El tratamiento de larga duración durante 10 semanas, revirtió completamente las alteraciones que se observaban en el modelo *Epm2b*^{-/-}, siendo tal que los ratones tratados alcanzaron valores medios de tiempo de latencia prácticamente iguales que los ratones control (Fig. 14).

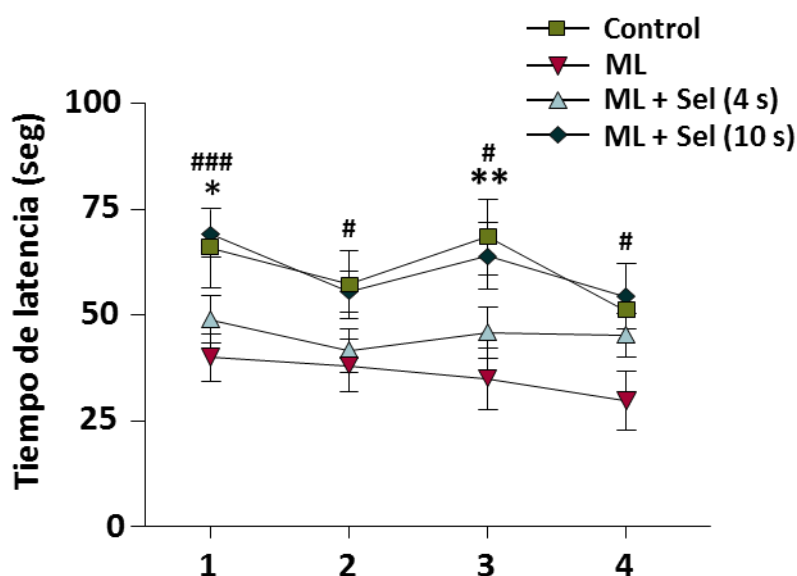


Figura 14. Tiempo de latencia en el rotarod de los ratones control y los ratones *Epm2b*^{-/-} en presencia y ausencia de tratamiento con selenato sódico de 4 y 10 semanas. Los tratamientos aumentan el tiempo de latencia, por lo que mejoran la coordinación motora. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ ratones control vs. *Epm2b*^{-/-}; # $p<0.05$ ### $p<0.001$ ratones *Epm2b*^{-/-} vs. ratones *Epm2b*^{-/-} con selenato sódico 10 semanas ($n = 12-25$). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

Por último dentro de los ensayos de comportamiento motor, se realizó el TST para analizar las posturas anómalas de los ratones. Una vez más, se confirmó la presencia de posturas anormales y discinesias en los ratones *Epm2b*^{-/-} (García-Cabrero et al., 2012). Se pudo observar que estos ratones mejoran ligeramente las alteraciones posturales con el tratamiento de selenato sódico durante 4 semanas, y lo hacen de forma más significativa con el tratamiento durante 10 semanas. Con ambos tratamientos, los ratones *Epm2b*^{-/-} presentaron un número significativamente menor de posturas anormales y discinesias (Fig. 15).

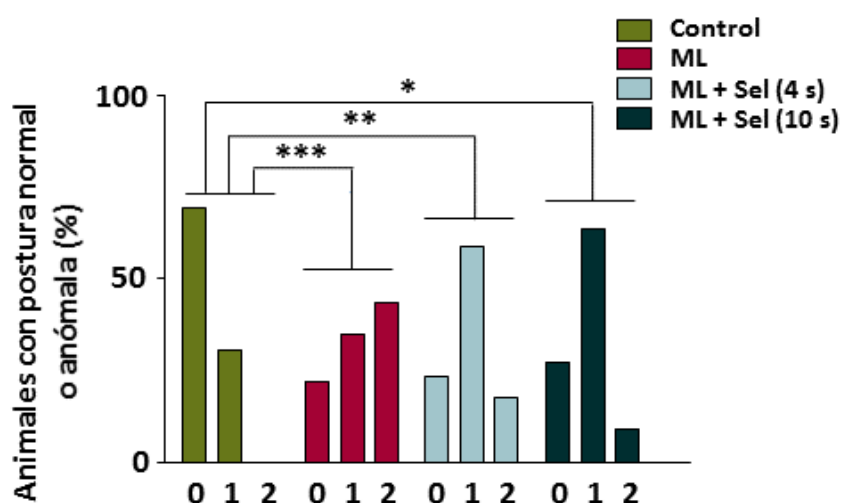


Figura 15. TST en ratones *Epm2b*^{-/-} en presencia y ausencia de tratamiento con selenato sódico de 4 y 10 semanas. Porcentaje de animales con postura normal de las extremidades posteriores (0), dobladas pegándose al abdomen de forma intermitente (1), dobladas pegadas al abdomen permanentemente (2). El selenato sódico disminuye las alteraciones de postura y las discinesias de los ratones *Epm2b*^{-/-}. Los datos se muestran como porcentajes y se analizaron mediante el test del Chi-cuadrado. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 (n = 12-25). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.3. Efectos del selenato sódico sobre los déficits de la memoria episódica

Tras estos estudios de comportamiento motor, se llevó a cabo el ORT para analizar los efectos del selenato sódico sobre las alteraciones de la memoria episódica que presenta el modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora (Garcia-Cabrero et al., 2012). Los resultados obtenidos indicaron que los déficits de memoria que presentan los ratones *Epm2b*^{-/-} desaparecen tras el tratamiento con selenato sódico de 4 semanas y mejoran aún más tras el tratamiento de 10 semanas, igualándose a los niveles de los ratones control (Fig. 16).

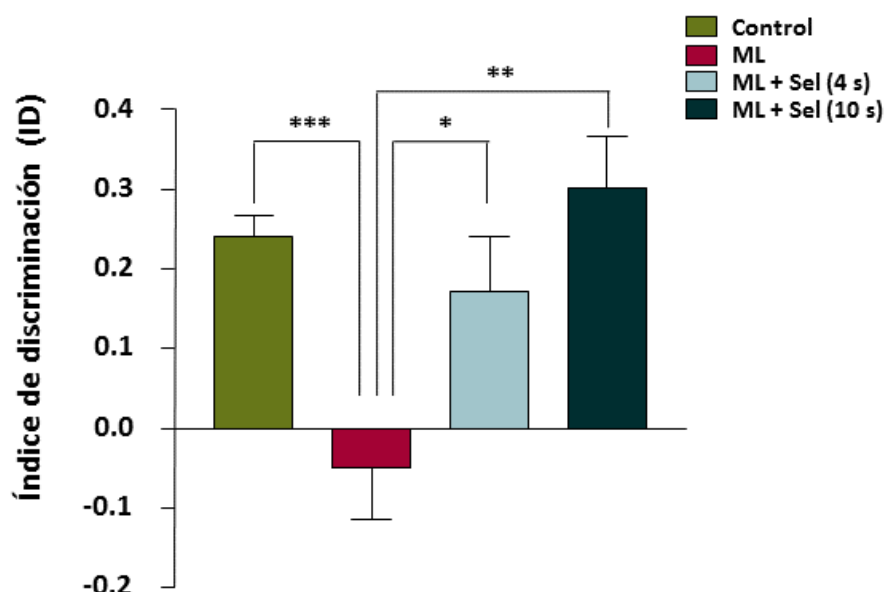


Figura 16. Análisis de la memoria episódica del modelo *Epm2b*^{-/-} mediante el ORT. El selenato sódico elimina las alteraciones de la memoria en este modelo. El índice de discriminación (ID) fue calculado como el cociente de la diferencia entre la exploración del objeto nuevo (tC) y el objeto conocido (tA), y el tiempo total de exploración (tT= tA+ tC) (ID= tC – tA / tT). Los datos se muestran como la media ± SEM. Para el análisis estadístico se realizó One-way ANOVA. * p<0.05; *** p<0.001 (n = 12-25). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.4. Valoración de la sensibilidad a PTZ

A continuación, se analizó la actividad epiléptica de los ratones *Epm2b*^{-/-} tras el tratamiento con selenato sódico. Para ello, se administró PTZ en dosis sub-convulsivas (30 mg/kg) y convulsivas (50 mg/kg) y se estudiaron las diferencias en la respuesta a este agente epileptógeno entre los ratones tratados y no tratados.

2.3.4.1. Efectos del selenato sódico sobre la sensibilidad de estos modelos a presentar mioclonías en respuesta a la inyección PTZ

En primer lugar se cuantificó el porcentaje de animales que mostraron mioclonías, tanto a 30 mg/kg como a 50 mg/kg. En respuesta a dosis sub-convulsivas, se observó, tal y como se había descrito previamente (Garcia-Cabrero et al., 2014), que había un mayor número de ratones *Epm2b*^{-/-} que presentan mioclonías (75%) que los controles (22%). El tratamiento con selenato sódico durante 4 semanas no produjo ningún efecto (73,5%). Sin embargo, con el tratamiento de 10 semanas, se observó un descenso en este porcentaje (53,9%) (Fig. 17A). El número ratones que presentan

mioclonías no muestra valores diferentes en respuesta a dosis convulsivas de PTZ entre los ratones control (93%) y los ratones *Epm2b*^{-/-} (85%) (Garcia-Cabrero et al., 2014). Por lo tanto, no se esperaba ningún efecto tras los tratamientos con selenato sódico. Así, el tratamiento de 4 semanas no afectó a este porcentaje (91.9%), pero, el porcentaje de ratones con mioclonías en respuesta a 50 mg/kg de PTZ descendió ligeramente a las 10 semanas de tratamiento (73%) (Fig. 17B).

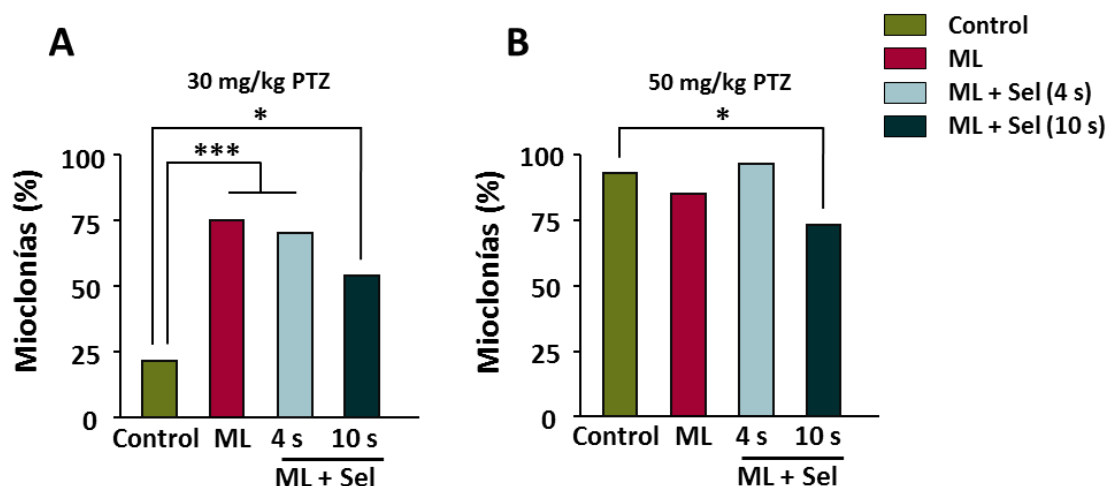


Figura 17. Administración de PTZ a ratones control y *Epm2b*^{-/-} en presencia y ausencia de tratamiento con selenato sódico. El porcentaje de animales con mioclonías a dosis subconvulsivas (30 mg/kg) (A) y a dosis convulsivas (50 mg/kg) (B) es menor tras el tratamiento prolongado con selenato sódico. Los datos se muestran como porcentajes y se analizaron mediante el test del Chi-cuadrado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ ($n = 12-25$). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.4.2. Crisis generalizadas tónico-clónicas y letalidad tras la administración de PTZ

También se estudió la aparición de crisis generalizadas tónico-clónicas y la letalidad en respuesta a dosis convulsivas de PTZ. El porcentaje de ratones control que desarrollan crisis generalizadas tónico-clónicas tras la inyección de PTZ es del 57% y en el caso de los ratones *Epm2b*^{-/-} del 49.2% (Fig. 18A) (Garcia-Cabrero et al., 2014), por lo que no existen diferencias en este aspecto. No obstante, se realizó el análisis tras los tratamientos con selenato sódico, y se observó que, con el tratamiento de 4 semanas el porcentaje de ratones *Epm2b*^{-/-} con crisis generalizadas tónico-clónicas descendió a un 19%, mientras que el tratamiento de 10 semanas evitó la aparición de crisis inducidas por PTZ (Fig. 18A). Algo similar ocurrió al estudiar la letalidad a dosis de 50

mg/kg de PTZ. El porcentaje de letalidad en animales control es del 33% y del 32.9% en el caso de los ratones *Epm2b*^{-/-} (Fig. 18B). Una vez más, se observó que no existen diferencias entre estos dos grupos en cuanto a letalidad inducida por PTZ (García-Cabrero et al., 2014). Sin embargo, el selenato sódico también produjo efectos en esta respuesta, ya que el porcentaje de letalidad descendió al 2.7% en los ratones *Epm2b*^{-/-} con tratamiento durante 4 semanas y en los tratados durante 10 semanas no se observó letalidad en respuesta al agente epileptógeno (Fig. 18B).

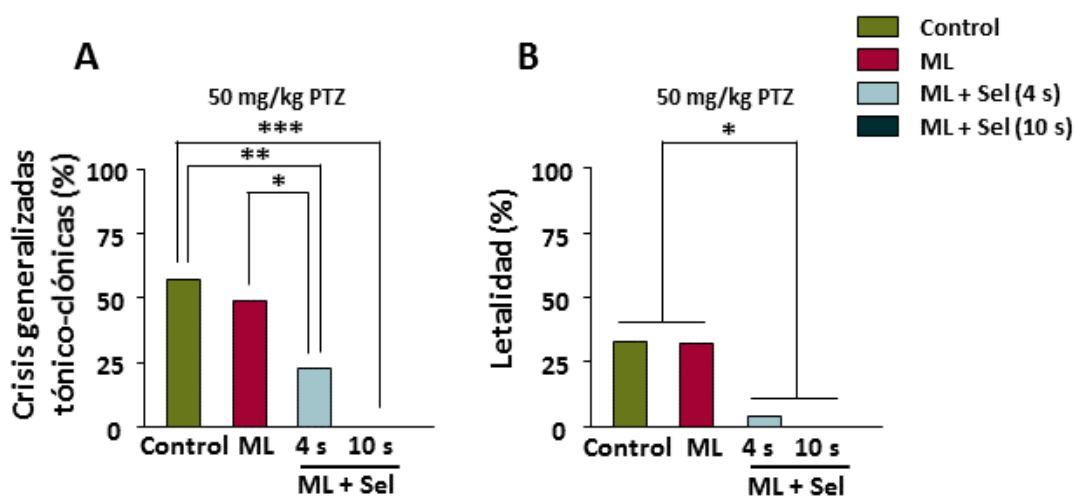


Figura 18. Administración de PTZ a ratones control y *Epm2b*^{-/-} en presencia y ausencia de tratamiento con selenato sódico. El porcentaje de ratones con crisis generalizadas tónico-clónicas (A) y la letalidad (B) en respuesta a dosis convulsivas (50 mg/kg) de PTZ disminuyen tras los tratamientos. Los datos se muestran como porcentajes y se analizaron mediante el test del Chi-cuadrado. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 (n = 12-25). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.5. Análisis histopatológicos tras los tratamientos con selenato sódico

2.3.5.1. Presencia de cuerpos de Lafora en cerebro

La característica histopatológica más peculiar de la enfermedad de Lafora es la presencia de cuerpos de Lafora en cerebro y otros tejidos. En este trabajo se analizó la presencia de estas inclusiones citoplasmáticas PAS-positivas en secciones equivalentes a nivel del asta de Ammon 1 (*cornus ammonis 1*, CA1) del hipocampo de ratones control, *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 y 10 semanas (Fig. 19).

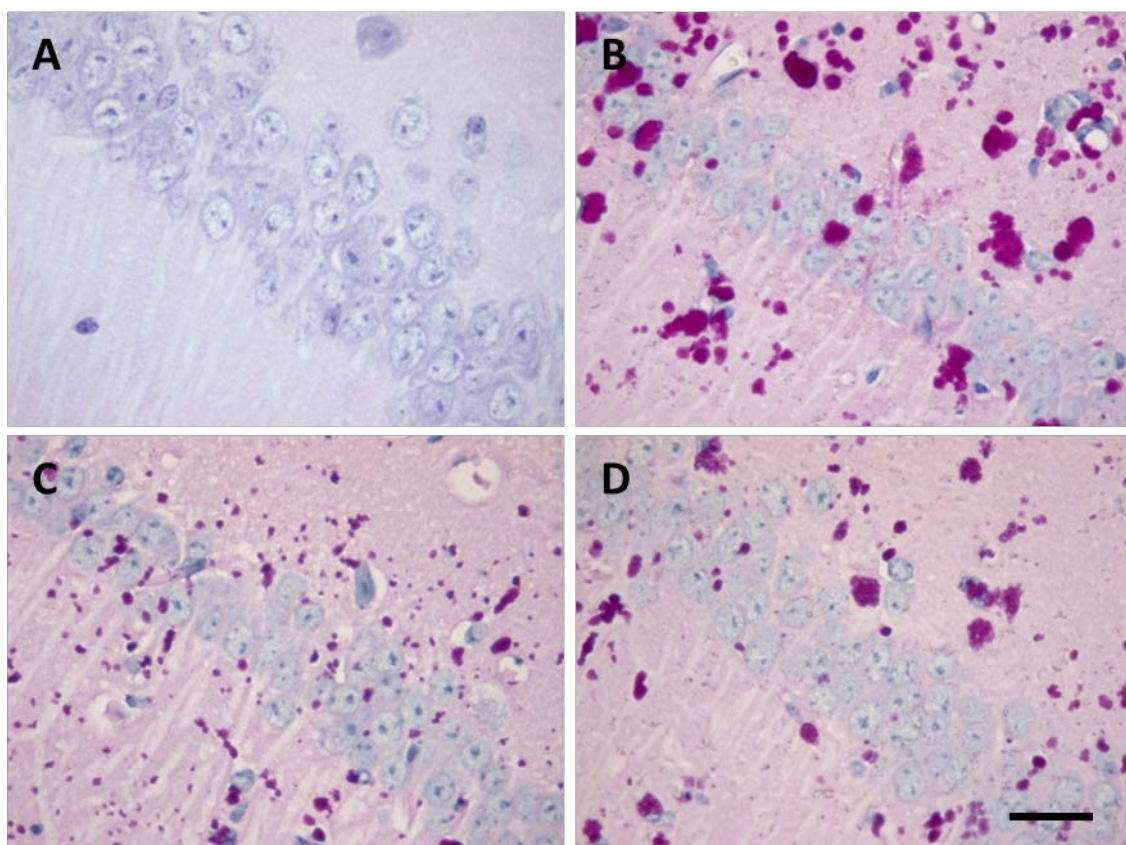


Figura 19. Cuerpos de Lafora en la región CA1 del hipocampo de ratones *Epm2b*^{-/-} después del tratamiento con selenato sódico. Análisis inmunohistoquímico de las inclusiones citoplasmáticas PAS+ en CA1 de ratones control (A), *Epm2b*^{-/-} (B) y *Epm2b*^{-/-} tras tratamiento con selenato sódico durante 4 (C) y 10 semanas (D) (barra de escala 25 μ m).

Se cuantificó el número de cuerpos de Lafora en la región CA1 del hipocampo en los ratones *Epm2b*^{-/-} tratados y sin tratar, pero no se vieron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 20). Este resultado sugiere que el selenato sódico no produce efectos sobre la acumulación de los cuerpos de Lafora.

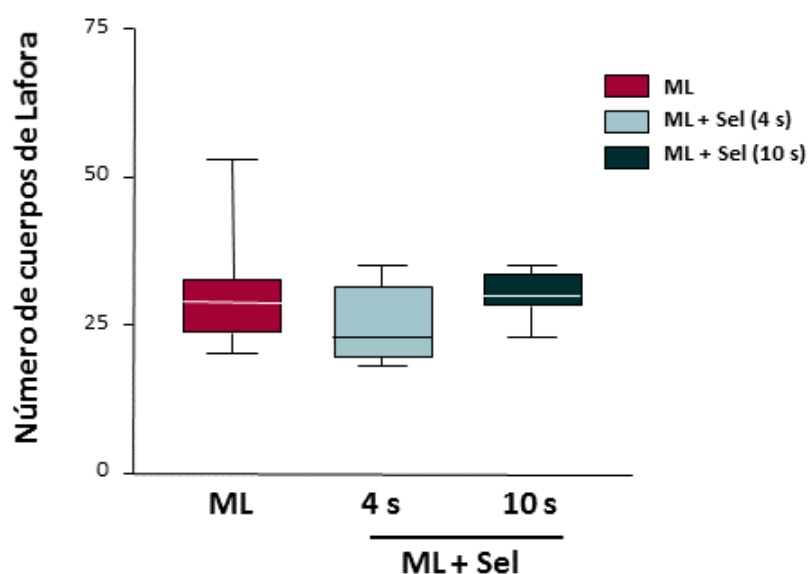


Figura 20. Número de Inclusiones PAS+ en ratones *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 y 10 semanas. Se llevó a cabo una cuantificación a ciegas de la región CA1 del hipocampo. Dos hemisferios de 3 ratones de cada grupo fueron cuantificados por dos observadores ciegos. El selenato sódico no produce cambios en el número de cuerpos de Lafora. Para el análisis estadístico se realizó un One-way ANOVA. ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.5.2. Efectos producidos por el selenato sódico sobre la degeneración neuronal

En estudios previos se había descrito la presencia de neurodegeneración en el modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora (Berthier et al., 2015). En este trabajo se estudiaron los efectos de los tratamientos con selenato sódico sobre esta degeneración neuronal. Para ello, se realizó una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo NeuN en secciones equivalentes de la región CA1 del hipocampo en ratones control y en ratones *Epm2b*^{-/-} tratados y sin tratar (Fig. 21).

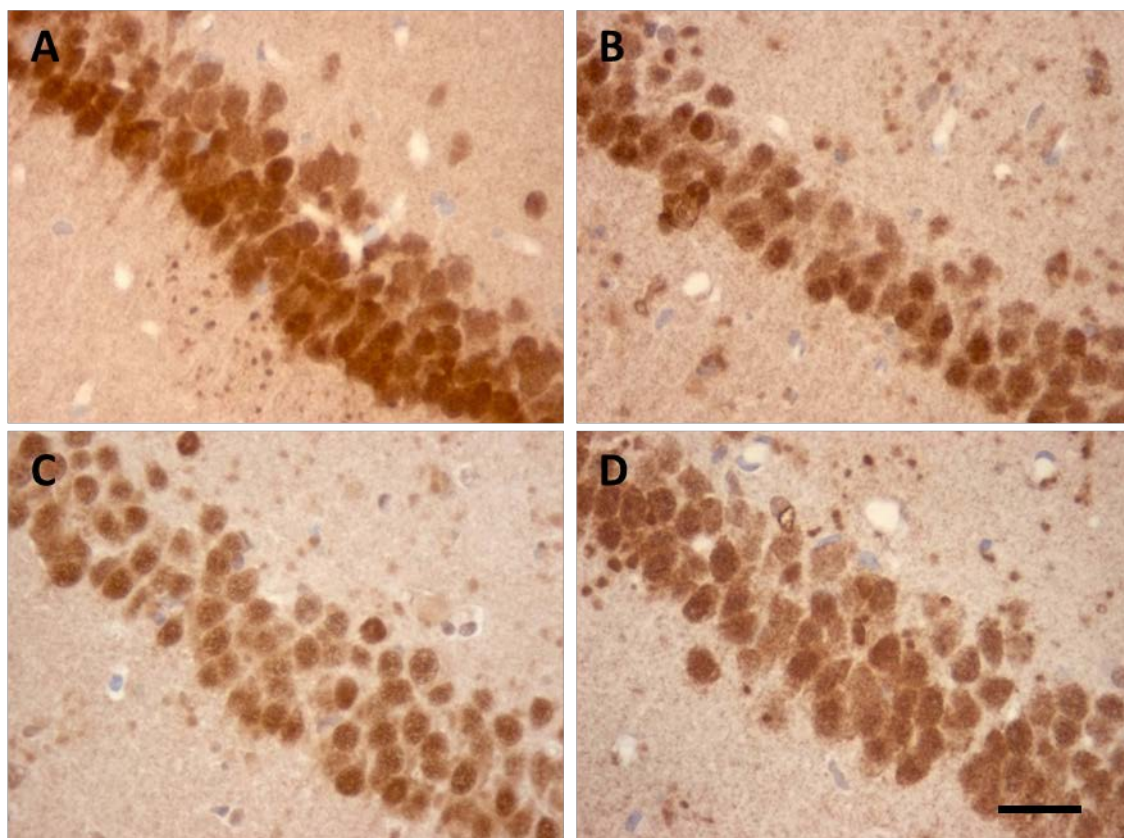


Figura 21. Núcleos neuronales identificados con el anticuerpo NeuN en CA1 de ratones *Epm2b*^{-/-} después del tratamiento con selenato sódico. Análisis inmunohistoquímico de las células presentes en CA1 de ratones control (A), *Epm2b*^{-/-} (B) y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 semanas (C) y 10 semanas (D) (barra de escala 25 μ m).

El anticuerpo NeuN produce un marcaje positivo de los núcleos de las neuronas, por lo que su cuantificación nos da cuenta del número de neuronas presentes en cada muestra. Así, se cuantificaron los núcleos positivos para NeuN y se observó que los ratones *Epm2b*^{-/-} presentan un menor número de neuronas que los ratones control. El tratamiento con selenato sódico durante 4 semanas no mostró ningún efecto sobre el recuento neuronal. Sin embargo, el tratamiento de 10 semanas redujo significativamente la pérdida neuronal observada en CA1 del hipocampo en ratones *Epm2b*^{-/-} (Fig. 22).

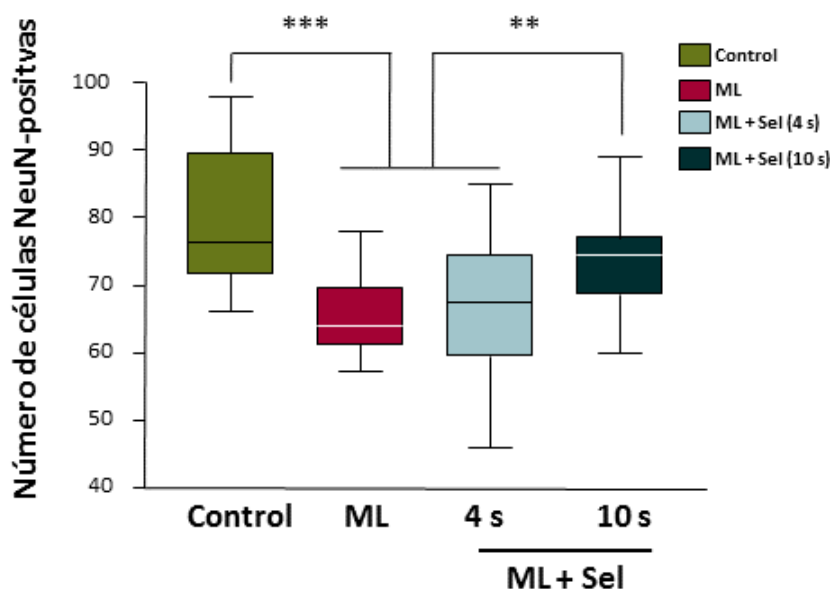


Figura 22. Número de células positivas para el marcaje de NeuN en ratones control, *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 y 10 semanas. Se llevó a cabo una cuantificación a ciegas de la región CA1 del hipocampo. Dos hemisferios de 3 ratones de cada grupo fueron cuantificados por dos observadores ciegos. El tratamiento de 10 semanas con selenato sódico disminuye la degeneración neuronal los ratones *Epm2b*^{-/-}. Para el análisis estadístico se realizó un One-way ANOVA. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

2.3.5.3. Estimación de la gliosis reactiva después de los tratamientos

Se ha descrito que la ausencia tanto de laforina como de malina en modelos animales de la enfermedad de Lafora produce gliosis reactiva en ciertas regiones de cerebro (Turnbull et al., 2011, Valles-Ortega et al., 2011). Así, en el modelo *Epm2b*^{-/-} que se ha utilizado en este trabajo, se ha descrito un aumento de las células positivas de GFAP en el hipocampo (Berthier et al., 2015). Por ello, también se realizó una cuantificación de la glía reactiva en el giro dentado del hipocampo de animales control, ratones *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} tratados con selenato sódico durante 4 y 10 semanas (Fig. 23).

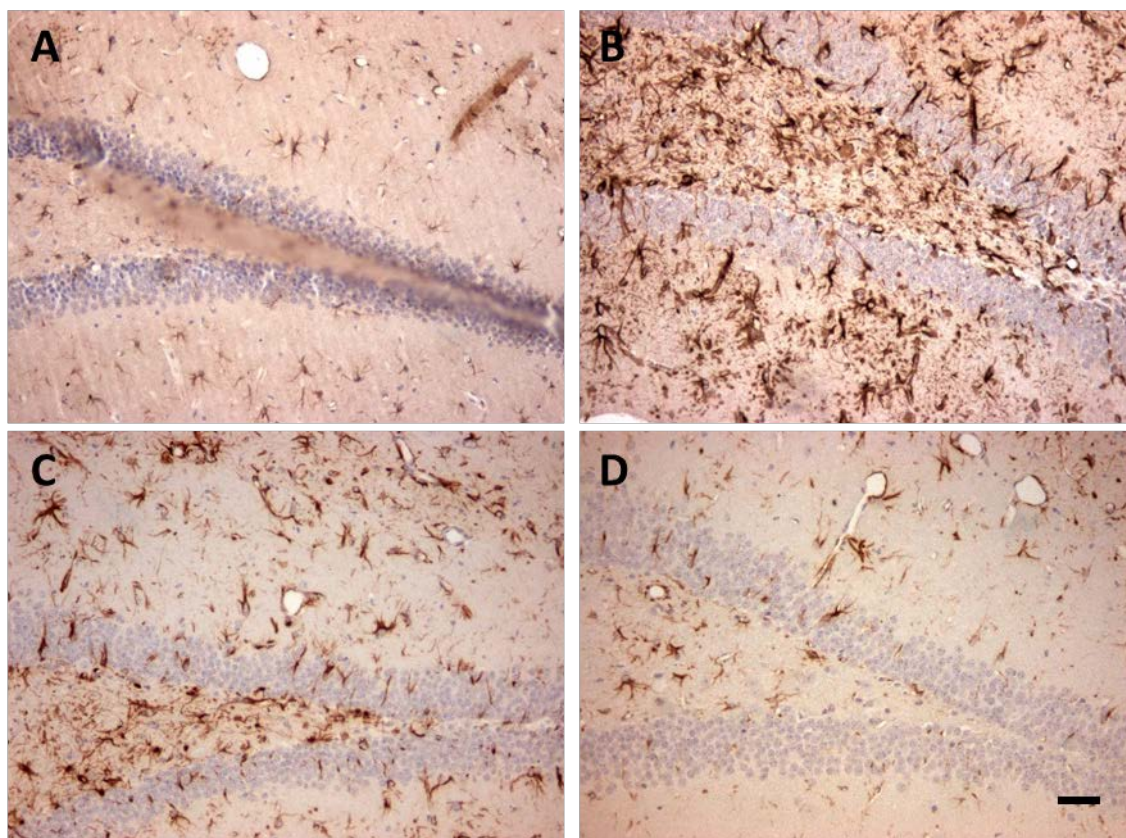


Figura 23. Análisis inmunohistoquímico de la gliosis reactiva, que se observa con el marcaje del anticuerpo GFAP en el giro dentado de ratones control (A), *Epm2b*^{-/-} (B) y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 semanas (C) y 10 semanas (D) (barra de escala 25 μ m).

Se cuantificó el número de células positivas para GFAP en el giro dentado de estos animales y se observó un notable incremento de la gliosis en el modelo *Epm2b*^{-/-}. Este aumento de la gliosis reactiva en ratones *Epm2b*^{-/-} disminuye ligeramente tras 4 semanas de tratamiento con selenato sódico y se acerca a los valores de los ratones control tras 10 semanas (Fig. 24).

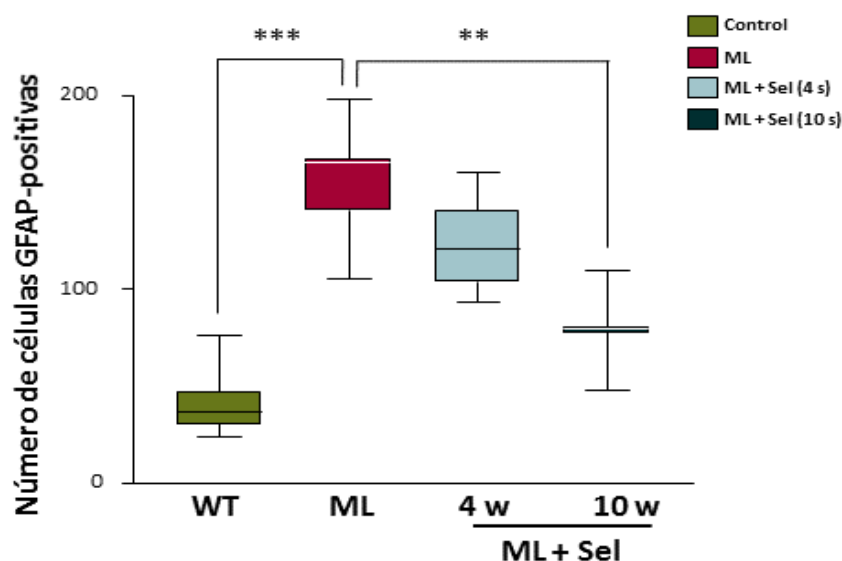


Figura 24. Número de células positivas para el marcaje de GFAP en ratones control, *Epm2b*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} con tratamiento de selenato sódico de 4 y 10 semanas. Se llevó a cabo una cuantificación a ciegas de la región del giro dentado. Dos hemisferios de 3 ratones de cada grupo fueron cuantificados por dos observadores ciegos. La gliosis reactiva se ve reducida en el cerebro de ratones *Epm2b*^{-/-} tras los tratamientos con selenato sódico. Para el análisis estadístico se realizó un One-way ANOVA. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ML: ratón *Epm2b*^{-/-}; Sel: Selenato sódico.

3. Estudio del posible mecanismo de acción del selenato sódico

Una vez observados los efectos del selenato en el modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora, se realizó el estudio de uno de los posibles mecanismos de acción implicados en los efectos beneficiosos de este tratamiento. Se ha descrito la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro de los ratones *Epm2a*^{-/-} en forma de NFTs (Puri et al., 2009). Además, el selenato sódico actúa a través de la activación de la PP2A, que a su vez defosforila la proteína tau en el cerebro de varios modelos. Por ello, se evaluó la presencia de agregados de la proteína tau hiperfosforilada en cerebro, tanto en modelo *Epm2a*^{-/-} como en el modelo *Epm2b*^{-/-}.

3.1. Evaluación de la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}

Se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo AT8 con el fin de determinar la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en muestras de cerebro de los dos modelos de enfermedad de Lafora (*Epm2b*^{-/-} y *Epm2a*^{-/-}). Adicionalmente,

para esta tinción con el anticuerpo AT8, se utilizaron controles positivos de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, que presentaba NFTs compuestos por la proteína tau hiperfosforilada. No se observó marcaje positivo con este anticuerpo en cerebro de ninguno de los grupos de ratones modelos de la enfermedad de Lafora, ni en ratones *Epm2a*^{-/-} (Fig. 25B), ni en *Epm2b*^{-/-} (Fig. 25C). Sin embargo, sí se observaron agregados de la proteína tau hiperfosforilada en el epítipo reconocido por el anticuerpo AT8 en las muestras de cerebro de los pacientes control con enfermedad de Alzheimer en forma de NFTs (Fig. 25A). Por ello, se dedujo que los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} no presentan hiperfosforilación de la proteína tau ni NFTs, como los que se encuentran en cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

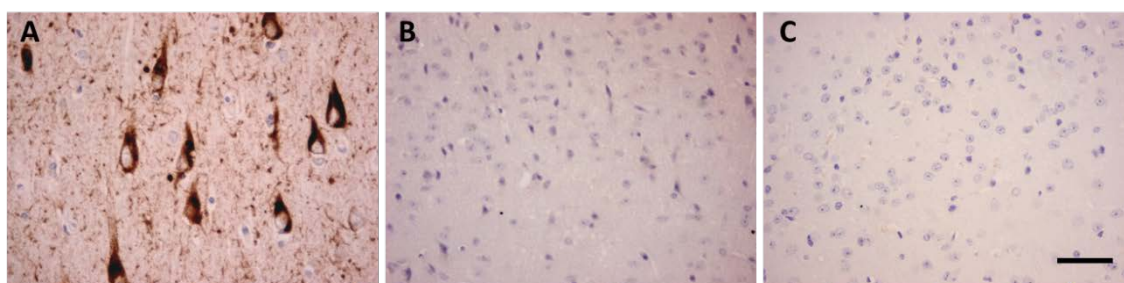


Figura 25. Análisis inmunohistoquímico de la proteína tau hiperfosforilada con el marcaje del anticuerpo AT8 en corteza cerebral. Se observan abundantes NFTs en neuronas de la corteza de un paciente con enfermedad de Alzheimer (A), mientras que no se observa marcaje en ratones *Epm2a*^{-/-} (B) y *Epm2b*^{-/-} (C) (barra de escala 25 μ m).

4. Estudios del miocardio en los modelos de la enfermedad de Lafora

Como se ha detallado en la Introducción, los pacientes con enfermedad de Lafora presentan cuerpos de Lafora en muchos tejidos además del cerebro, como es el caso del corazón. Se han descrito pacientes con otras enfermedades de acumulación de glucógeno que presentan una cardiomiopatía hipertrófica (Arad et al., 2005). Sin embargo, existe poca bibliografía sobre el estado del corazón en pacientes con enfermedad de Lafora. Los ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} también presentan cuerpos de Lafora en el corazón como se ha indicado anteriormente. Por ello, en este trabajo se ha llevado a cabo un análisis del miocardio en los dos modelos de la enfermedad de Lafora en colaboración con el grupo del Dr. Enrique Lara del CNIC.

4.1. Estudios de ecocardiografía

En primer lugar se realizaron estudios de ecocardiografía de los ratones control, los ratones *Epm2a*^{-/-} y los ratones *Epm2b*^{-/-} a diferentes edades, de 8 a 10 meses y de 14 a 16 meses.

4.1.1. Análisis ecocardiográfico del modelo *Epm2a*^{-/-}

Se comenzó el estudio ecocardiográfico comparando los datos de los ratones *Epm2a*^{-/-} con los ratones control. En todos los parámetros analizados no se encontraron diferencias en el grupo de 8 a 10 meses de edad. Sin embargo, el grupo de 14 a 16 meses de edad presenta un engrosamiento tanto de la pared anterior (Fig. 26A) como de la posterior (Fig. 26B) del ventrículo izquierdo en diástole (1.1 mm en ratones *Epm2a*^{-/-} frente a 0.8 mm en ratones control). Estos datos son indicativos de una hipertrofia del ventrículo izquierdo que, al tener un engrosamiento generalizado de todas las paredes, se considera concéntrica. Además, se observan diferencias significativas en el porcentaje de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en este mismo grupo de edad, presentando los ratones *Epm2a*^{-/-} valores por debajo de los mostrados por los ratones control (47% en ratones *Epm2a*^{-/-} frente al 58% en los ratones control) (Fig. 26C). Por lo tanto, los ratones *Epm2a*^{-/-}, presentan además de una hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo, una pérdida de la función cardíaca consecuencia de un deterioro en la contracción del ventrículo izquierdo.

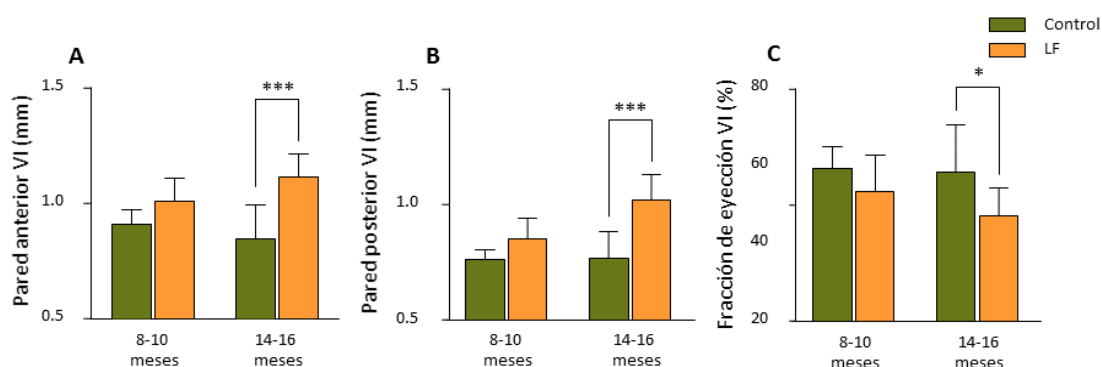


Figura 26. Diámetro de la pared anterior (A), posterior (B) y fracción de eyección (C) del ventrículo izquierdo en los ratones control y *Epm2a*^{-/-}. Se observa un engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo y un descenso de la fracción de eyección en los ratones *Epm2a*^{-/-} a los 14-16 meses de edad. Los datos se muestran como la media \pm SEM. Para el análisis estadístico se llevó a cabo el test de la t de student. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ (n=10). LF: ratón *Epm2a*^{-/-}

4.1.2. Análisis ecocardiográfico del modelo *Epm2b*^{-/-}

A continuación, se realizó el mismo estudio ecocardiográfico para comparar los ratones control con los ratones *Epm2b*^{-/-}. Como en el caso del modelo *Epm2a*^{-/-}, no se encontraron diferencias entre los datos de los animales control y *Epm2b*^{-/-} en el grupo de 8 a 10 meses de edad. En el grupo de 14 a 16 meses de edad, los ratones *Epm2b*^{-/-} muestran un engrosamiento tanto de la pared anterior (Fig. 27A) como de la posterior (Fig. 27B) en diástole (1 mm en ratones *Epm2b*^{-/-} frente a 0.8 mm en ratones control). Por lo tanto, se puede concluir que los ratones *Epm2b*^{-/-} presentan una hipertrofia del ventrículo izquierdo que, al igual que en los ratones *Epm2a*^{-/-} por mostrar un engrosamiento en todas las paredes, se considera concéntrica. En cuanto al porcentaje de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, los ratones *Epm2b*^{-/-} mostraron valores muy inferiores a los ratones control (43% en ratones *Epm2b*^{-/-} frente a 57% en ratones control) (Fig. 27C). Estos ratones presentan, como en el caso del modelo *Epm2a*^{-/-} un deterioro de la contracción del ventrículo izquierdo. Este dato es indicativo de una pérdida de función cardíaca, que, sumado a la hipertrofia del ventrículo izquierdo, podría tener como consecuencia un fallo cardíaco.

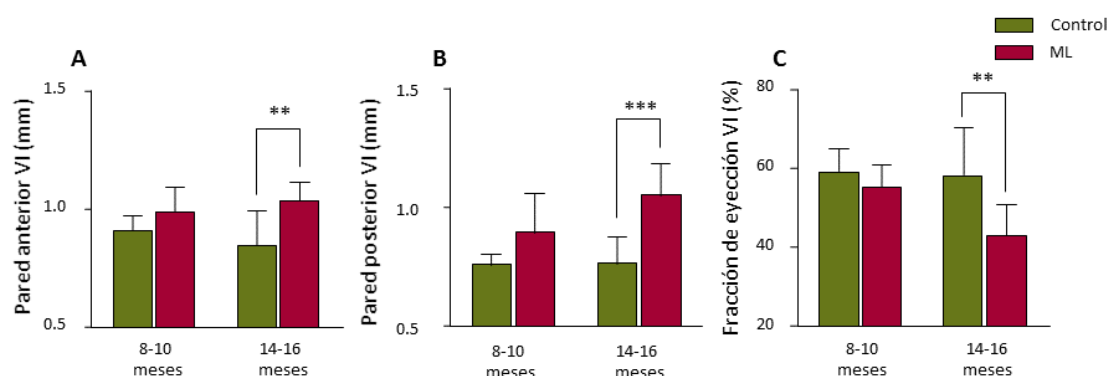


Figura 27. Diámetro de la pared anterior (A), posterior (B) y fracción de eyección (C) del ventrículo izquierdo en los ratones control y *Epm2b*^{-/-}. Se observa un engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo y un descenso de la fracción de eyección en los ratones *Epm2b*^{-/-} a los 14-16 meses de edad. Los datos se muestran como la media \pm SEM. Para el análisis estadístico se llevó a cabo el test de la t de student. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ ($n = 10$). ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

Tanto en el modelo *Epm2a*^{-/-} como en el modelo *Epm2b*^{-/-} se tomaron imágenes del eje paraesternal largo y paraesternal corto en modo bidimensional y en modo M. En estas imágenes se aprecia el engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo (Fig. 28).

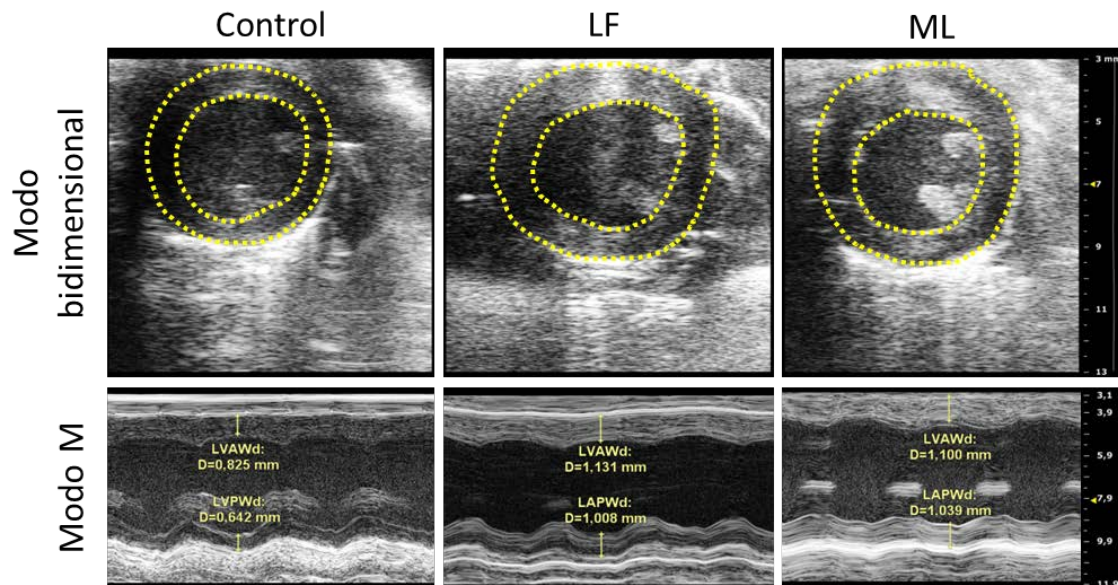


Figura 28. Imágenes ecocardiográficas en modo bidimensional y en modo M de los ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. LVAWd (left ventricle anterior wall in diastole) pared anterior del ventrículo izquierdo en diástole, LVPWd (left ventricle posterior wall in diastole) pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole. LF: ratón *Epm2a*^{-/-}; ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

4.2. Análisis de la masa cardíaca

Con el fin de comprobar que la hipertrofia del ventrículo izquierdo que se observa por ecocardiograma se corresponde con un aumento de la masa cardíaca, se analizó el peso del corazón relativo a la longitud de la tibia en los ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} del grupo de 14 a 16 meses de edad. Ambos modelos presentan una masa cardíaca significativamente mayor que los ratones control (Fig. 29).

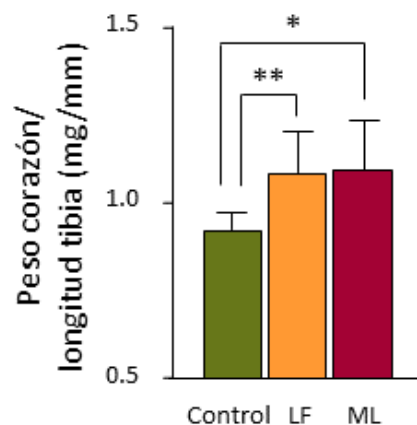


Figura 29. Peso del corazón relativo a la longitud de la tibia en los ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Se observa un aumento de la masa cardíaca en ambos modelos. Los datos se muestran como la media \pm SEM. Para el análisis estadístico se llevó a cabo el test de la t de student. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (n=10). LF: ratón *Epm2a*^{-/-}; ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

4.3. Análisis histológicos del miocardio

Finalmente, se analizó de forma detallada la presencia de cuerpos de Lafora en el corazón de los modelos de enfermedad de Lafora. Para ello, se realizó la tinción de PAS en muestras de ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} del grupo de 14 a 16 meses de edad. Se observó una abundante presencia de cuerpos de Lafora en ambos modelos (Fig. 30).

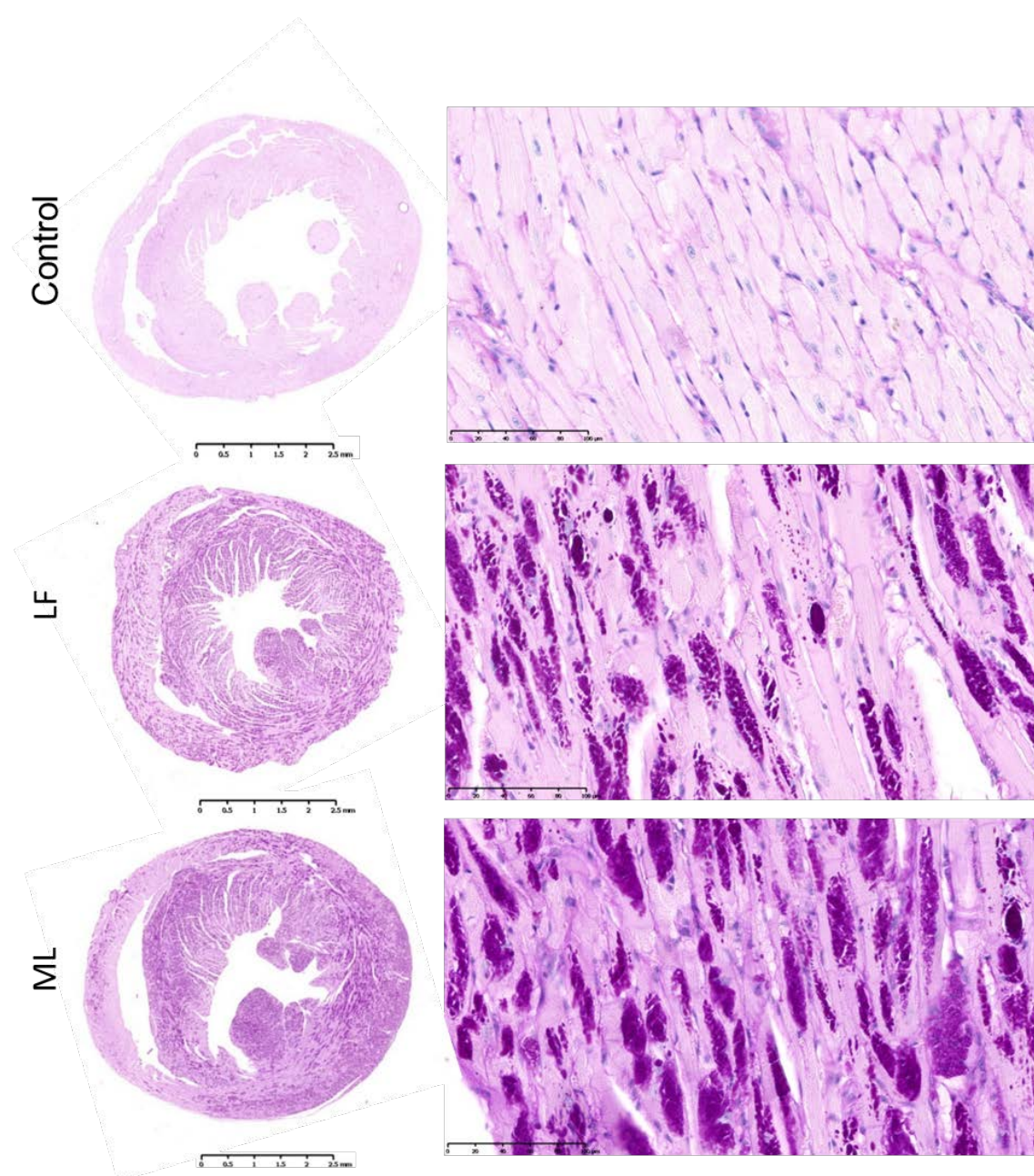


Figura 30. Tinción de PAS en ratones control, *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. Se observan cuerpos de Lafora en ambos modelos. LF: ratón *Epm2a*^{-/-}; ML: ratón *Epm2b*^{-/-}.

DISCUSIÓN

A pesar de los recientes avances en el conocimiento de las bases moleculares y fisiopatológicas de la enfermedad de Lafora, en la actualidad no existen tratamientos efectivos para los pacientes que la sufren. La acumulación de cuerpos de Lafora en el cerebro, los fallos en los mecanismos de eliminación de proteínas anómalas y el estrés oxidativo son alteraciones descritas en modelos animales que pueden contribuir a la degeneración neuronal, a la progresión de la enfermedad y a la aparición de crisis epilépticas. En la práctica clínica, la pauta terapéutica más habitual consiste en tratar las crisis epilépticas con fármacos antiepilépticos, sin tratar la enfermedad en sí. Hasta el momento, hay pocos estudios realizados en busca de tratamientos dirigidos a mejorar los defectos celulares y moleculares que desencadenan en procesos neurodegenerativos. En este trabajo, se describen nuevas características patológicas de dos modelos animales de la enfermedad de Lafora y, se ensayan varios tratamientos que se han elegido en base a los nuevos conocimientos sobre las causas de esta enfermedad.

1. Hiperexcitabilidad en respuesta a PTZ de los modelos animales de Lafora

La relación entre los cuerpos de Lafora y la aparición de la actividad electroencefalográfica anormal continúa sin ser conocida. Los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} muestran alteraciones electroencefalográficas similares a las presentes en los pacientes con enfermedad de Lafora, aunque más leves y menos frecuentes (Ganesh et al., 2002a, Garcia-Cabrero et al., 2012). Por otro lado, se ha visto que una línea de ratones nulos para la expresión de malina presentan una mayor susceptibilidad a las crisis epilépticas inducidas por ácido kaínico (Valles-Ortega et al., 2011). En un trabajo previo del laboratorio se analizó la actividad epiléptica de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} adultos a través de la evaluación de la respuesta a PTZ. El PTZ es un antagonista no-competitivo de los receptores GABA_A, induce crisis epilépticas generalizadas y se ha usado extensamente para ensayar fármacos antiepilépticos en animales de experimentación (Stone, 1970). Ambos modelos de ratón de la enfermedad de Lafora muestran una mayor sensibilidad para desarrollar mioclonías con dosis sub-convulsivas de PTZ, y un menor umbral y menor tiempo de latencia para

desarrollar crisis generalizadas tónico-clónicas con dosis convulsivas (Garcia-Cabrero et al., 2014). En este trabajo se ha completado este estudio mediante el análisis del patrón de las crisis generalizadas tónico-clónicas en respuesta a la inyección de PTZ. Se ha observado que, tanto en los ratones control como en ambos modelos de la enfermedad de Lafora, la inyección de PTZ a dosis convulsivas produce una primera fase consistente en periodos de inmovilidad, espasmos e hiperextensión de las extremidades que progresan hasta la aparición de una segunda fase de crisis generalizada tónico-clónica propiamente dicha. Sin embargo, los registros de vídeo-EEG intracraneales muestran patrones de descargas específicos y diferentes entre sí. Así, además de las diferencias ya descritas en tiempo de latencia y duración de las crisis, los ratones control presentan un patrón de descargas rítmicas mientras que los *Epm2a*^{-/-} muestran patrones de descargas más irregulares. La hipersensibilidad a PTZ observada en estos modelos de ratón sugiere que la falta de las proteínas laforina y malina produce alguna alteración en el sistema GABAérgico, ya que el PTZ actúa a través de la inhibición de los receptores GABA_A. Además, se han descrito alteraciones en el desarrollo de las neuronas GABAérgicas en la corteza cerebral, que son anteriores a la formación de los cuerpos de Lafora y que podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Ortolano et al., 2014). Con el fin de comprender si estas alteraciones desencadenan una hiperexcitabilidad en edades tempranas, se decidió analizar la respuesta a la administración de dosis convulsivas de PTZ en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} a los 15 y 30 días de edad. No se observaron diferencias en la respuesta a PTZ, ni en cuanto al porcentaje de animales con mioclonías y crisis generalizadas tónico-clónicas ni en cuanto a la letalidad, en comparación con los ratones control de las mismas edades, lo que indica que no hay diferencias en la excitabilidad neuronal a edades tempranas.

2. Efectos de los tratamientos con 4-PBA y metformina sobre el fenotipo epiléptico del modelo *Epm2b*^{-/-}

Los cuerpos de Lafora presentan reacción positiva al analizarlos con anticuerpos anti-ubiquitina (Ganesh et al., 2002a, Rao et al., 2010, Criado et al., 2012, Garcia-Cabrero et al., 2012). Además, también presentan chaperonas y subunidades del

proteosoma (Rao et al., 2010, Sinadinos et al., 2014). Se ha observado que el complejo laforina-malina suprime la toxicidad celular de proteínas mal-plegadas promoviendo su degradación a través del complejo ubiquitina-proteosoma (Garyali et al., 2009). Además, se han descrito defectos en autofagia en los modelos *Epm2a*^{-/-} (Aguado et al., 2010) y *Epm2b*^{-/-} (Criado et al., 2012). En un estudio reciente, se han llevado a cabo tratamientos con 4-PBA, una chaperona química que revierte el mal plegamiento y agregación de proteínas, y con metformina, que activa la AMPK, y que a su vez puede promover la autofagia, en el modelo *Epm2b*^{-/-}. Ambos tratamientos reducen el número de cuerpos de Lafora, los agregados de poliubiquitina y la neurodegeneración, produciendo una mejora en el comportamiento de estos animales (Berthier et al., 2015). Para completar el estudio del efecto de estos tratamientos en el modelo *Epm2b*^{-/-}, en este trabajo se ha realizado un análisis de la actividad epiléptica de estos ratones a través del análisis de la respuesta a la administración de dosis convulsivas de PTZ. Se observó que tanto los tratamientos con 4-PBA como de metformina en ratones de 2 meses de edad durante 8 semanas reducen la sensibilidad de este modelo al agente epileptógeno PTZ. Ambos tratamientos producen un descenso en el porcentaje de animales que muestran crisis generalizadas tónico-clónicas inducidas por PTZ. Además, mientras que el tratamiento con 4-PBA produce un notable descenso de la letalidad, el tratamiento con metformina la elimina totalmente.

Como se ha mencionado anteriormente, el PTZ actúa a través de los receptores GABA_A, por lo que se cree que la hipersensibilidad que presentan los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} a este agente puede deberse a alguna alteración en el sistema GABAérgico. El tratamiento con 4-PBA en el modelo *Epm2b*^{-/-} produce un incremento de la chaperona BIP/Grp78, que está involucrada en la mejora de la disfunción proteostática (Berthier et al., 2015). Como el 4-PBA reduce la hipersensibilidad a PTZ, parece que la hiperexcitabilidad de estos ratones a este agente podría tener alguna relación con la disfunción proteostática o con la acumulación de chaperonas y subunidades del proteosoma en los cuerpos de Lafora. Así, se puede postular que la acción beneficiosa del 4-PBA se produciría mediante un aumento de la proteostasis, que repercutiría en una mejora de las alteraciones del sistema GABAérgico de estos modelos. En cuanto a los efectos de la metformina en este modelo, previamente se había observado que su

administración producía una activación de la AMPK, aunque los niveles de los marcadores de autofagia no se veían afectados (Berthier et al., 2015). Se ha cuestionado si los defectos en autofagia son causa o consecuencia de la patología de la enfermedad de Lafora (Puri and Ganesh, 2012). En un estudio con uno de los modelos de ratón *Epm2b*^{-/-}, en el que además se produjo una deficiencia de expresión completa o parcial de la GS, se rescató el fenotipo normal, desapareciendo también los defectos de autofagia (Duran et al., 2014). Además, en este mismo estudio también se observó en otros dos modelos experimentales de acumulación de glucógeno sin defectos en malina, que se presentaban alteraciones en autofagia, por lo que se sugirió que estos defectos en autofagia son una consecuencia de la acumulación de glucógeno y no su causa (Duran et al., 2014). Por otro lado, se ha sugerido que existe una vinculación de la activación de la AMPK con la inhibición de la GS (Carling and Hardie, 1989). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de las proteínas, y las formas fosforiladas de la GS y la GSK3 β en los ratones tratados con metformina (Berthier et al., 2015). Así, la metformina produce efectos beneficiosos en el modelo *Epm2b*^{-/-} y activa la AMPK pero sin activar la autofagia ni alterar la actividad de la GS, por lo que todavía no se conoce el mecanismo de acción implicado en estos procesos.

El 4-PBA se utiliza comúnmente en clínica para el manejo crónico de pacientes con trastornos del ciclo de la urea. Sin embargo, su uso en la práctica clínica se está extendiendo, y las investigaciones sobre sus beneficios en otras enfermedades están incrementando (Iannitti and Palmieri, 2011). La metformina es un medicamento comúnmente utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II. Como en el caso del 4-PBA, su uso en la práctica clínica se está extendiendo, y también se están realizando más investigaciones sobre sus posibles efectos beneficiosos en otras enfermedades. Ambos fármacos son seguros y ya están aprobados para su uso clínico en diferentes patologías neurológicas, por lo tanto, su uso en pacientes con enfermedad de Lafora podría ser sencillo e inmediato.

3. Efectos del tratamiento con selenato sódico sobre los síntomas y la hiperexcitabilidad en el modelo *Epm2b*^{-/-}

En este trabajo también se han evaluado los efectos del selenato sódico sobre las alteraciones neurológicas del modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora. El selenato sódico presenta propiedades antioxidantes y anticonvulsivas (Brenneisen et al., 2005, Rehni and Singh, 2013) y se han asociado niveles bajos de selenio con el deterioro cognitivo en Alzheimer, y con una mayor predisposición a la presencia de crisis epilépticas, tanto en humanos como en animales de laboratorio tratados con PTZ (Akbaraly et al., 2007, Cardoso et al., 2010, Rehni and Singh, 2013). El tratamiento con selenato sódico ha producido mejoras significativas en varias de las alteraciones neurológicas presentes en el modelo *Epm2b*^{-/-}. Así, la coordinación motora evaluada con el rotarod, se recuperó gradualmente tras el tratamiento, tal y como se había descrito previamente en varios modelos animales de tauopatías (Corcoran et al., 2010b, van Eersel et al., 2010). Transcurridas 10 semanas de tratamiento con selenato, los ratones *Epm2b*^{-/-} son indistinguibles de los ratones control en cuanto a los resultados obtenidos en el rotarod. El selenato sódico también mejora gradualmente el rendimiento de la memoria episódica en este modelo *Epm2b*^{-/-}, resultando en la desaparición de los déficits de memoria de estos ratones tras 10 semanas de tratamiento. Mejoras en el rendimiento de la memoria producidas por tratamientos con selenato sódico ya se habían descrito previamente en modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer (van Eersel et al., 2010). Las posturas anormales y discinesias características de los ratones *Epm2b*^{-/-} también se ven reducidas tras el tratamiento con selenato sódico. Además, el selenato sódico también reduce la sensibilidad del modelo *Epm2b*^{-/-} a PTZ, disminuyendo el porcentaje de animales que presentan mioclonías y crisis generalizadas tónico-clónicas inducidas por la administración de PTZ, así como la letalidad producida por este agente. La reducción de la hiperexcitabilidad tras el tratamiento con selenato sódico también había sido descrita previamente en otros modelos animales de epilepsia (Jones et al., 2012).

La gliosis y la degeneración neuronal también disminuyeron tras el tratamiento con selenato sódico. Así, el efecto positivo del selenato sódico sobre las alteraciones

neurológicas del modelo *Epm2b*^{-/-} podría atribuirse a una reducción de la muerte neuronal y de la gliosis más que a una acción sobre la agregación de glucógeno anormal, puesto que no se observó ningún efecto en el número de cuerpos de Lafora tras los tratamientos. El mecanismo por el cual el selenato sódico produce una reducción de la neurodegeneración y de la gliosis y mejora las alteraciones de comportamiento del modelo *Epm2b*^{-/-} no se conoce en el momento actual. Sin embargo, se ha descrito que en pacientes con enfermedad de Lafora hay un incremento de los niveles de marcadores de daño oxidativo en DNA y RNA (Hayashi, 2009), un incremento en los niveles de ROS (Roma-Mateo et al., 2015a) y un descenso de la respuesta antioxidante (Garcia-Gimenez et al., 2013). Además, en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} también se han descrito alteraciones en diversas enzimas antioxidantes y un incremento del estrés oxidativo (Roma-Mateo et al., 2015b), y en el análisis proteómico llevado a cabo en los ratones *Epm2b*^{-/-} se observó un incremento en los niveles de los canales aniónicos dependientes de voltaje 2 (*voltage dependent anion channel 2*, VDAC2) (Roma-Mateo et al., 2015a). Los VDAC1 (*voltage dependent anion channel 1*, VDAC1) y VDAC2 se localizan en la membrana mitocondrial externa y se relacionan con la mitofagia (Novak, 2012), que también ha sido relacionada con la superproducción de ROS (Kurihara et al., 2012). El selenio regula la expresión y actividad de selenoenzimas y por lo tanto protege frente al daño celular inducido por estrés oxidativo (Rehni and Singh, 2013) mientras que el selenato sódico regula la fosforilación de proteínas clave involucradas en el estrés oxidativo en modelos animales de diferentes patologías (Chen et al., 2014). Por todo ello se puede razonar que el selenato sódico podría estar actuando a través de una reducción del estrés oxidativo en el modelo *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora.

Tras el tratamiento de selenato sódico de 4 semanas en los ratones *Epm2b*^{-/-}, se observa una ligera mejoría en la actividad motora espontánea, aunque el tratamiento prolongado durante 10 semanas empeora este comportamiento. Este efecto desfavorable también se observa al analizar el tiempo transcurrido por los animales en la zona central de la arena del actímetro, ya que el tratamiento corto con selenato sódico resulta en una disminución del estado de ansiedad, mientras que el tratamiento prolongado de 10 semanas reduce este efecto favorable. Se han descrito algunos

efectos adversos en ensayos clínicos con selenato sódico, como por ejemplo náuseas, diarrea, fatiga, espasmos musculares, alopecia y alteraciones ungueales (Corcoran et al., 2010a). Exposiciones prolongadas a selenio también producen fatiga y otros síntomas (Holness et al., 1989). No se observó ningún efecto adverso relacionado con el selenato sódico durante su administración a los ratones *Epm2b^{-/-}*, aunque es posible que la regresión gradual de la mejora motora inicial y del estado de ansiedad se deba a efectos adversos del selenato sódico.

Recientemente, un ensayo clínico ha concluido que el selenato sódico es seguro y bien tolerado en pacientes con enfermedad de Alzheimer en dosis de hasta 30 mg por día durante 24 semanas (Malpas et al., 2016). Por ello, a pesar de no conocerse el mecanismo de acción del selenato sódico en el modelo *Epm2b^{-/-}*, sus efectos beneficiosos en las alteraciones neurológicas de este modelo, así como su seguridad demostrada en pacientes, permiten considerar el traslado de estos resultados a ensayos con pacientes de la enfermedad de Lafora.

4. Relación del tratamiento con selenato sódico y la proteína tau hiperfosforilada

Los resultados del tratamiento con selenato sódico muestran mejoras en las alteraciones de comportamiento que presentan los ratones *Epm2b^{-/-}*. Como se ha descrito previamente, el selenato sódico también produce mejoras de los síntomas neurológicos y la epilepsia en otros modelos murinos. En dos de estos trabajos, se postuló que esos efectos se producían a través de la activación de la PP2A por el selenato sódico y la consecuente desfosforilación de la proteína tau. Además, se había observado que la activación de la PP2A y la reducción de la hiperfosforilación de la proteína tau prevenían la aparición de procesos neurodegenerativos y crisis epilépticas (Corcoran et al., 2010b, van Eersel et al., 2010, Jones et al., 2012), así como también producían una atenuación de la epileptogénesis (Liu et al., 2016). En el modelo *Epm2a^{-/-}* se había descrito la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en forma de NFTs en cerebro y músculo esquelético (Puri et al., 2009, Machado-Salas et al., 2012). Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína laforina posee un dominio DSP

(Minassian et al., 1998, Serratosa et al., 1999, Ganesh et al., 2000) y un dominio CBD (Wang et al., 2002, Worby et al., 2006). Se ha propuesto que laforina, a través de su dominio fosfatasa, podría unirse y desfosforilar a la proteína tau (Puri et al., 2009). En este trabajo se ha analizado la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en Ser202/Thr205 mediante el anticuerpo AT8 en el cerebro de ratones *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-}. A pesar de que su presencia está descrita en el cerebro del modelo *Epm2a*^{-/-}, en este trabajo no se ha observado esta proteína anormal en ninguno de los modelos analizados. La hiperfosforilación de tau se ha asociado a niveles elevados de la forma activa de la GSK3 β en el modelo *Epm2a*^{-/-} (Puri et al., 2009). La GSK3 es la principal proteína inhibitoria de la GS y se activa por desfosforilación de Ser21 en el caso de la isoforma α y de Ser9 en el caso de la isoforma β . En un estudio previo se postuló que laforina es una fosfatasa de GSK3 β en Ser9 y que, por lo tanto, sería capaz de inactivar a la GS a través de la activación de GSK3 β (Lohi et al., 2005). Este hecho supondría que en ausencia de laforina se incrementarían los niveles de la forma inactiva de GSK3 β , de forma que no podría estar implicada en la hiperfosforilación de tau. Así, sería difícil encontrar acúmulos de la proteína tau hiperfosforilada como consecuencia de la ausencia de laforina. Por otro lado, otro amplio estudio demostró que la GSK3 no es un sustrato de laforina (Worby et al., 2006), lo que también desvincularía la ausencia de laforina con la presencia de la proteína tau hiperfosforilada, como hemos observado en este trabajo tanto en el modelo *Epm2a*^{-/-} como en el *Epm2b*^{-/-}. Por todo ello, se considera que no se pueden vincular los efectos positivos del selenato sódico observados en el modelo *Epm2b*^{-/-} con la activación de la PP2A y la desfosforilación de tau.

5. Alteraciones cardíacas de los modelos animales de Lafora

Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes con la enfermedad de Lafora también presentan cuerpos de Lafora en el corazón (Lafora and Glueck, 1911). Sin embargo, no existen estudios de miocardio en pacientes, aunque se han descrito unos pocos casos con alteraciones cardíacas, con fallos cardíacos o arritmias (de Graaf et al., 1989, Oksel et al., 1999, Wick and Byard, 2006). Por otro lado, existe un grupo de enfermedades con un almacenamiento anormal de glucógeno, denominadas

glucogenosis, que también son causadas por mutaciones en genes reguladores del metabolismo del glucógeno, y que implican cardiomiopatías hipertróficas y anomalías del sistema nervioso (Arad et al., 2005). En estas enfermedades, el glucógeno o sus metabolitos intermediarios, se encuentran en vacuolas patológicas en varios tejidos, como el músculo, el corazón o el cerebro. Dado que los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora también presentan cuerpos de Lafora en el músculo cardíaco, en este trabajo también se ha realizado un estudio del estado funcional del miocardio para valorar los efectos producidos por la falta de expresión de las proteínas laforina y malina y de la acumulación de los cuerpos de Lafora. Así, en primer lugar se han realizado estudios histopatológicos para evaluar la presencia de cuerpos de Lafora en el miocardio de estos modelos a los 15 meses de edad, observándose una abundante cantidad de estos agregados. Además, el análisis funcional por ecocardiografía de ambos modelos, muestra la existencia de un engrosamiento de la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo del miocardio, indicativo de la presencia de una hipertrofia del ventrículo izquierdo, así como un aumento de la masa cardíaca. Asimismo, se ha observado un descenso de la fracción de eyección del corazón en ambos modelos, hecho que sugiere una asociación de la hipertrofia del ventrículo izquierdo con una pérdida de la función sistólica.

Los defectos cardíacos de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} observados en este trabajo aparecen a una edad avanzada. Ya que en los pacientes los síntomas neurológicos aparecen pronto, y el deterioro progresivo lleva al fallecimiento en 5-10 años tras la presentación de los primeros síntomas, puede que esta rápida progresión de los síntomas neurológicos impida la aparición de los síntomas cardíacos, aunque no se han realizado estudios funcionales en corazón. Sin embargo, como se ha mostrado en algunos estudios, existen varias mutaciones que dan lugar a fenotipos más leves de la enfermedad de Lafora, con una progresión del deterioro neurológico más lenta (Ferlazzo et al., 2014). En estos casos el análisis ecocardiográfico puede ser interesante, ya que la ralentización de la progresión de los síntomas neurológicos podría dar lugar a la aparición de síntomas cardíacos. Además, en el caso de que se consiguieran tratamientos efectivos que redujesen o mejorasen ligeramente los síntomas neurológicos de los pacientes, también se debería considerar la posible

aparición de complicaciones en el corazón. Teniendo en cuenta el fenotipo cardíaco observado en los modelos de ratón de la enfermedad, debería considerarse una evaluación de estas alteraciones en pacientes, ya que la hipertrofia del ventrículo izquierdo asociada con una pérdida de la función sistólica puede llevar a muchas complicaciones e, incluso, a la muerte.

Los resultados de este trabajo profundizan en el conocimiento del fenotipo epiléptico de los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de la enfermedad de Lafora, lo que puede facilitar la evaluación de nuevos tratamientos en estos modelos. Además, se han descrito efectos beneficiosos de los tratamientos con 4-PBA, metformina y selenato sódico sobre las alteraciones del modelo *Epm2b*^{-/-}. Estos compuestos han mostrado su seguridad en ensayos clínicos, por lo que ya podrían realizarse ensayos con estos fármacos o con combinaciones de los mismos en un intento de mejorar los síntomas de la enfermedad de Lafora. Las alteraciones cardíacas encontradas en los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} sugieren que deberían realizarse evaluaciones funcionales del corazón en pacientes con una progresión más lenta de la enfermedad para evitar posibles fallos cardíacos. Todavía queda mucho trabajo por realizar y muchos mecanismos por descubrir para llegar a la aplicación de tratamientos efectivos en la práctica clínica. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores y abren nuevas perspectivas dirigidas al ensayo de fármacos en pacientes con esta grave enfermedad, para la que no existen tratamientos a excepción de los fármacos antiepilépticos.

CONCLUSIONES

- 1- Los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de enfermedad de Lafora muestran una mayor sensibilidad al agente epileptógeno PTZ y un patrón característico de crisis inducidas por este agente.
- 2- En edades tempranas, a pesar de la presencia de procesos neurodegenerativos, los modelos de enfermedad de Lafora no muestran una mayor sensibilidad a PTZ.
- 3- Los tratamientos con 4-PBA y metformina en el modelo *Epm2b*^{-/-} reducen la hipersensibilidad al agente epileptógeno PTZ.
- 4- El tratamiento con selenato sódico durante 4 semanas en el modelo *Epm2b*^{-/-} mejora los defectos motores y de memoria, así como la hipersensibilidad a PTZ.
- 5- El tratamiento prolongado con selenato sódico durante 10 semanas en el modelo *Epm2b*^{-/-}: 1) Elimina completamente las alteraciones motoras y de memoria; 2) reduce el porcentaje de animales con mioclonías en respuesta a PTZ y elimina totalmente la aparición de crisis generalizadas y la mortalidad; 3) reduce la muerte neuronal y la gliosis.
- 6- Los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} no presentan agregados de la proteína tau hiperfosforilada en cerebro, por lo que el selenato sódico no parece estar actuando en el control de la fosforilación de la proteína tau.
- 7- Los modelos *Epm2a*^{-/-} y *Epm2b*^{-/-} de enfermedad de Lafora presentan abundantes cuerpos de Lafora en el miocardio y muestran hipertrofia del ventrículo izquierdo con pérdida de función cardíaca.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, J. N., Satishchandra, P. & Shankar, S. K. 1995. Familial progressive myoclonus epilepsy: clinical and electrophysiologic observations. *Epilepsia*, 36, 429-34.
- Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., De Cordoba, S. R., Knecht, E. & Rubinsztein, D. C. 2010. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet*, 19, 2867-76.
- Akbaraly, T. N., Hininger-Favier, I., Carriere, I., Arnaud, J., Gourlet, V., Roussel, A. M. & Berr, C. 2007. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiology*, 18, 52-8.
- Arad, M., Maron, B. J., Gorham, J. M., Johnson, W. H., Jr., Saul, J. P., Perez-Atayde, A. R., Spirito, P., Wright, G. B., Kanter, R. J., Seidman, C. E. & Seidman, J. G. 2005. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 352, 362-72.
- Benton, D. 2002. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutr Neurosci*, 5, 363-74.
- Berkovic, S. F., Andermann, F., Carpenter, S. & Wolfe, L. S. 1986. Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N Engl J Med*, 315, 296-305.
- Berthier, A., Paya, M., Garcia-Cabrero, A. M., Ballester, M. I., Heredia, M., Serratosa, J. M., Sanchez, M. P. & Sanz, P. 2015. Pharmacological Interventions to Ameliorate Neuropathological Symptoms in a Mouse Model of Lafora Disease. *Mol Neurobiol*.
- Bouskila, M., Hirshman, M. F., Jensen, J., Goodyear, L. J. & Sakamoto, K. 2008. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E28-35.
- Bouskila, M., Hunter, R. W., Ibrahim, A. F., Delattre, L., Pegg, M., Van Diepen, J. A., Voshol, P. J., Jensen, J. & Sakamoto, K. 2010. Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab*, 12, 456-66.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H. & Sies, H. 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med*, 26, 256-67.
- Cardoso, B. R., Ong, T. P., Jacob-Filho, W., Jaluul, O., Freitas, M. I. & Cozzolino, S. M. 2010. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *Br J Nutr*, 103, 803-6.
- Carling, D. & Hardie, D. G. 1989. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1012, 81-6.
- Carling, D., Thornton, C., Woods, A. & Sanders, M. J. 2012. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *Biochem J*, 445, 11-27.
- Carpenter, S. & Karpati, G. 1981. Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. *Neurology*, 31, 1564-8.
- Carpenter, S., Karpati, G., Andermann, F., Jacob, J. C. & Andermann, E. 1974. Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. *Neurology*, 24, 531-8.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B. & Morton, A. J. 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, 19, 3248-57.

- Cataldo, A. M. & Broadwell, R. D. 1986. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol*, 15, 511-24.
- Coimbra, N. C., Castro-Souza, C., Segato, E. N., Nora, J. E., Herrero, C. F., Tedeschi-Filho, W. & Garcia-Cairasco, N. 2001a. Post-ictal analgesia: involvement of opioid, serotonergic and cholinergic mechanisms. *Brain Res*, 888, 314-320.
- Coimbra, N. C., Freitas, R. L., Savoldi, M., Castro-Souza, C., Segato, E. N., Kishi, R., Weltson, A. & Resende, G. C. 2001b. Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of mu(1)-opioid receptor. *Brain Res*, 903, 216-21.
- Corcoran, N. M., Hovens, C. M., Michael, M., Rosenthal, M. A. & Costello, A. J. 2010a. Open-label, phase I dose-escalation study of sodium selenate, a novel activator of PP2A, in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*, 103, 462-8.
- Corcoran, N. M., Martin, D., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Nguyen, T., Nheu, L., Sundstrom, L. E., Costello, A. J. & Hovens, C. M. 2010b. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci*, 17, 1025-33.
- Criado, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran-Trio, L., Garcia-Cabrero, A. M., Vernia, S., San Millan, B., Heredia, M., Roma-Mateo, C., Mouron, S., Juana-Lopez, L., Dominguez, M., Navarro, C., Serratosa, J. M., Sanchez, M., Sanz, P., Bovolenta, P., Knecht, E. & Rodriguez De Cordoba, S. 2012. Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum Mol Genet*, 21, 1521-33.
- Chan, E. M., Ackerley, C. A., Lohi, H., Ianzano, L., Cortez, M. A., Shannon, P., Scherer, S. W. & Minassian, B. A. 2004. Laforin preferentially binds the neurotoxic starch-like polyglucosans, which form in its absence in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet*, 13, 1117-29.
- Chan, E. M., Bulman, D. E., Paterson, A. D., Turnbull, J., Andermann, E., Andermann, F., Rouleau, G. A., Delgado-Escueta, A. V., Scherer, S. W. & Minassian, B. A. 2003a. Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J Med Genet*, 40, 671-5.
- Chan, E. M., Young, E. J., Ianzano, L., Munteanu, I., Zhao, X., Christopoulos, C. C., Avanzini, G., Elia, M., Ackerley, C. A., Jovic, N. J., Bohlega, S., Andermann, E., Rouleau, G. A., Delgado-Escueta, A. V., Minassian, B. A. & Scherer, S. W. 2003b. Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet*, 35, 125-7.
- Chen, P., Wang, L., Wang, Y., Li, S., Shen, L., Liu, Q. & Ni, J. 2014. Phosphoproteomic profiling of selenate-treated Alzheimer's disease model cells. *PLoS One*, 9, e113307.
- Cheng, A., Zhang, M., Gentry, M. S., Worby, C. A., Dixon, J. E. & Saltiel, A. R. 2007. A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease. *Genes Dev*, 21, 2399-409.
- De Graaf, A. S., Ancker, E., Rutherford, G. S., Van Der Walt, J. J. & Rossouw, D. J. 1989. Lafora-body disease with optic atrophy, macular degeneration and cardiac failure. *J Neurol Sci*, 93, 69-84.
- Delgado-Escueta, A. V. 2007. Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 7, 428-33.

- Depaoli-Roach, A. A., Contreras, C. J., Segvich, D. M., Heiss, C., Ishihara, M., Azadi, P. & Roach, P. J. 2015. Glycogen phosphomonoester distribution in mouse models of the progressive myoclonic epilepsy, Lafora disease. *J Biol Chem*, 290, 841-50.
- Depaoli-Roach, A. A., Tagliabracci, V. S., Segvich, D. M., Meyer, C. M., Irimia, J. M. & Roach, P. J. 2010. Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J Biol Chem*, 285, 25372-81.
- Dubey, D. & Ganesh, S. 2008. Modulation of functional properties of laforin phosphatase by alternative splicing reveals a novel mechanism for the EPM2A gene in Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet*, 17, 3010-20.
- Dubey, D., Parihar, R. & Ganesh, S. 2012. Identification and characterization of novel splice variants of the human EPM2A gene mutated in Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Genomics*, 99, 36-43.
- Duran, J., Gruart, A., Garcia-Rocha, M., Delgado-Garcia, J. M. & Guinovart, J. J. 2014. Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease. *Hum Mol Genet*, 23, 3147-56.
- Eloqayli, H., Dahl, C. B., Gotestam, K. G., Unsgard, G., Hadidi, H. & Sonnewald, U. 2003. Pentylentetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J Neurochem*, 85, 1200-7.
- Erakovic, V., Zupan, G., Varljen, J., Laginja, J. & Simonic, A. 2001. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol--induced seizures. *Epilepsy Res*, 43, 165-73.
- Ferlazzo, E., Canafoglia, L., Michelucci, R., Gambardella, A., Gennaro, E., Pasini, E., Riguzzi, P., Plasmati, R., Volpi, L., Labate, A., Gasparini, S., Villani, F., Casazza, M., Viri, M., Zara, F., Minassian, B. A., Turnbull, J., Serratosa, J. M., Guerrero-Lopez, R., Franceschetti, S. & Aguglia, U. 2014. Mild Lafora disease: clinical, neurophysiologic, and genetic findings. *Epilepsia*, 55, e129-33.
- Fernagut, P. O., Diguët, E., Stefanova, N., Biran, M., Wenning, G. K., Canioni, P., Bioulac, B. & Tison, F. 2002. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience*, 114, 1005-17.
- Fernandez-Sanchez, M. E., Criado-Garcia, O., Heath, K. E., Garcia-Fojeda, B., Medrano-Fernandez, I., Gomez-Garre, P., Sanz, P., Serratosa, J. M. & Rodriguez De Cordoba, S. 2003. Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum Mol Genet*, 12, 3161-71.
- Filomeni, G., De Zio, D. & Cecconi, F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22, 377-88.
- Ganesh, S., Agarwala, K. L., Amano, K., Suzuki, T., Delgado-Escueta, A. V. & Yamakawa, K. 2001. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 1046-53.
- Ganesh, S., Agarwala, K. L., Ueda, K., Akagi, T., Shoda, K., Usui, T., Hashikawa, T., Osada, H., Delgado-Escueta, A. V. & Yamakawa, K. 2000. Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum Mol Genet*, 9, 2251-61.

- Ganesh, S., Amano, K., Delgado-Escueta, A. V. & Yamakawa, K. 1999. Isolation and characterization of mouse homologue for the human epilepsy gene, EPM2A. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 24-8.
- Ganesh, S., Delgado-Escueta, A. V., Sakamoto, T., Avila, M. R., Machado-Salas, J., Hoshii, Y., Akagi, T., Gomi, H., Suzuki, T., Amano, K., Agarwala, K. L., Hasegawa, Y., Bai, D. S., Ishihara, T., Hashikawa, T., Itohara, S., Cornford, E. M., Niki, H. & Yamakawa, K. 2002a. Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet*, 11, 1251-62.
- Ganesh, S., Suzuki, T. & Yamakawa, K. 2002b. Alternative splicing modulates subcellular localization of laforin. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 1134-7.
- Ganesh, S., Tsurutani, N., Suzuki, T., Ueda, K., Agarwala, K. L., Osada, H., Delgado-Escueta, A. V. & Yamakawa, K. 2003. The Lafora disease gene product laforin interacts with HIRIP5, a phylogenetically conserved protein containing a NifU-like domain. *Hum Mol Genet*, 12, 2359-68.
- Garcia-Cabrero, A. M., Marinas, A., Guerrero, R., De Cordoba, S. R., Serratosa, J. M. & Sanchez, M. P. 2012. Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71, 413-21.
- Garcia-Cabrero, A. M., Sanchez-Elexpuru, G., Serratosa, J. M. & Sanchez, M. P. 2014. Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylentetrazole. *Front Neurosci*, 8, 291.
- Garcia-Gimenez, J. L., Seco-Cervera, M., Aguado, C., Roma-Mateo, C., Dasi, F., Priego, S., Markovic, J., Knecht, E., Sanz, P. & Pallardo, F. V. 2013. Lafora disease fibroblasts exemplify the molecular interdependence between thioredoxin 1 and the proteasome in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 65, 347-59.
- Garyali, P., Segvich, D. M., Depaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. 2014. Protein degradation and quality control in cells from laforin and malin knockout mice. *J Biol Chem*, 289, 20606-14.
- Garyali, P., Siwach, P., Singh, P. K., Puri, R., Mittal, S., Sengupta, S., Parihar, R. & Ganesh, S. 2009. The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet*, 18, 688-700.
- Gayarre, J., Duran-Trio, L., Criado Garcia, O., Aguado, C., Juana-Lopez, L., Crespo, I., Knecht, E., Bovolenta, P. & Rodriguez De Cordoba, S. 2014. The phosphatase activity of laforin is dispensable to rescue Epm2a^{-/-} mice from Lafora disease. *Brain*, 137, 806-18.
- Gentry, M. S., Worby, C. A. & Dixon, J. E. 2005. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8501-6.
- Gomez-Abad, C., Gomez-Garre, P., Gutierrez-Delicado, E., Saygi, S., Michelucci, R., Tassinari, C. A., Rodriguez De Cordoba, S. & Serratosa, J. M. 2005. Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology*, 64, 982-6.
- Han, Y., Xie, N., Cao, L., Zhao, X., Liu, X., Jiang, H. & Chi, Z. 2011. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha signaling provides neuroprotection in status epilepticus in rats. *Neurosci Lett*, 500, 133-8.

- Hayashi, M. 2009. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*, 29, 1-8.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.
- Hetz, C. & Mollereau, B. 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 15, 233-49.
- Holness, D. L., Taraschuk, I. G. & Nethercott, J. R. 1989. Health status of copper refinery workers with specific reference to selenium exposure. *Arch Environ Health*, 44, 291-7.
- Iannitti, T. & Palmieri, B. 2011. Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs R D*, 11, 227-49.
- Ianzano, L., Young, E. J., Zhao, X. C., Chan, E. M., Rodriguez, M. T., Torrado, M. V., Scherer, S. W. & Minassian, B. A. 2004. Loss of function of the cytoplasmic isoform of the protein laforin (EPM2A) causes Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mutat*, 23, 170-6.
- Ianzano, L., Zhang, J., Chan, E. M., Zhao, X. C., Lohi, H., Scherer, S. W. & Minassian, B. A. 2005. Lafora progressive Myoclonus Epilepsy mutation database-EPM2A and NHLRC1 (EPM2B) genes. *Hum Mutat*, 26, 397.
- Ianzano, L., Zhao, X. C., Minassian, B. A. & Scherer, S. W. 2003. Identification of a novel protein interacting with laforin, the EPM2a progressive myoclonus epilepsy gene product. *Genomics*, 81, 579-87.
- Jansen, A., Andermann, E. 2007. Progressive Myoclonus Epilepsy, Lafora Type. In: Pagon, R., Adam, Mp., Ardinger, Hh., et al. (ed.). Seattle (WA): University of Washington, Seattle: GeneReviews®
- Jara-Prado, A., Ochoa, A., Alonso, M. E., Lima Villeda, G. A., Fernandez-Valverde, F., Ruano-Calderon, L., Vargas-Canas, S., Duron, R. M., Delgado-Escueta, A. V. & Martinez-Juarez, I. E. 2014. Late onset Lafora disease and novel EPM2A mutations: breaking paradigms. *Epilepsy Res*, 108, 1501-10.
- Jennesson, M., Milh, M., Villeneuve, N., Guedj, E., Marie, P. Y., Vignal, J. P., Raffo, E., Vespignani, H., Mancini, J. & Maillard, L. 2010. Posterior glucose hypometabolism in Lafora disease: early and late FDG-PET assessment. *Epilepsia*, 51, 708-11.
- Jones, N. C., Nguyen, T., Corcoran, N. M., Velakoulis, D., Chen, T., Grundy, R., O'brien, T. J. & Hovens, C. M. 2012. Targeting hyperphosphorylated tau with sodium selenate suppresses seizures in rodent models. *Neurobiol Dis*, 45, 897-901.
- Kaslow, H. R., Lesikar, D. D., Antwi, D. & Tan, A. W. 1985. L-type glycogen synthase. Tissue distribution and electrophoretic mobility. *J Biol Chem*, 260, 9953-6.
- Keskil, I. S., Keskil, Z. A., Canseven, A. G. & Seyhan, N. 2001. No effect of 50 Hz magnetic field observed in a pilot study on pentylenetetrazol-induced seizures and mortality in mice. *Epilepsy Res*, 44, 27-32.
- Knecht, E., Aguado, C., Carcel, J., Esteban, I., Esteve, J. M., Ghislat, G., Moruno, J. F., Vidal, J. M. & Saez, R. 2009. Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2427-43.
- Kriegenburg, F., Poulsen, E. G., Koch, A., Kruger, E. & Hartmann-Petersen, R. 2011. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 15, 2265-99.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T. & Kang, D. 2012. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species

- and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem*, 287, 3265-72.
- Lafora, G. 1911. Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen. zugleich Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem.: Virchows Arch. Pathol. Anat.
- Lafora, G. & Glueck, B. 1911. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.*
- Lee, J., Giordano, S. & Zhang, J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441, 523-40.
- Lin, J. H., Walter, P. & Yen, T. S. 2008. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 3, 399-425.
- Liu, S. J., Zheng, P., Wright, D. K., Dezs, G., Braine, E., Nguyen, T., Corcoran, N. M., Johnston, L. A., Hovens, C. M., Mayo, J. N., Hudson, M., Shultz, S. R., Jones, N. C. & O'brien, T. J. 2016. Sodium selenate retards epileptogenesis in acquired epilepsy models reversing changes in protein phosphatase 2A and hyperphosphorylated tau. *Brain*, 139, 1919-38.
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C. & Zheng, P. 2009. Deletions and missense mutations of EPM2A exacerbate unfolded protein response and apoptosis of neuronal cells induced by endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Genet*, 18, 2622-31.
- Lohi, H., Ianzano, L., Zhao, X. C., Chan, E. M., Turnbull, J., Scherer, S. W., Ackerley, C. A. & Minassian, B. A. 2005. Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet*, 14, 2727-36.
- Lopez-Olaneta, M. M., Villalba, M., Gomez-Saliner, J. M., Jimenez-Borreguero, L. J., Breckenridge, R., Ortiz-Sanchez, P., Garcia-Pavia, P., Ibanez, B. & Lara-Pezzi, E. 2014. Induction of the calcineurin variant CnAbeta1 after myocardial infarction reduces post-infarction ventricular remodelling by promoting infarct vascularization. *Cardiovasc Res*, 102, 396-406.
- Machado-Salas, J., Avila-Costa, M. R., Guevara, P., Guevara, J., Duron, R. M., Bai, D., Tanaka, M., Yamakawa, K. & Delgado-Escueta, A. V. 2012. Ontogeny of Lafora bodies and neurocytoskeleton changes in Laforin-deficient mice. *Exp Neurol*, 236, 131-40.
- Malpas, C. B., Vivash, L., Genc, S., Saling, M. M., Desmond, P., Steward, C., Hicks, R. J., Callahan, J., Brodtmann, A., Collins, S., Macfarlane, S., Corcoran, N. M., Hovens, C. M., Velakoulis, D. & O'brien, T. J. 2016. A Phase IIa Randomized Control Trial of VEL015 (Sodium Selenate) in Mild-Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 54, 223-32.
- Minassian, B. A., Lee, J. R., Herbrick, J. A., Huizenga, J., Soder, S., Mungall, A. J., Dunham, I., Gardner, R., Fong, C. Y., Carpenter, S., Jardim, L., Satishchandra, P., Andermann, E., Snead, O. C., 3rd, Lopes-Cendes, I., Tsui, L. C., Delgado-Escueta, A. V., Rouleau, G. A. & Scherer, S. W. 1998. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet*, 20, 171-4.
- Navarro, P., Guerrero, R., Gallego, E., Avila, J., Luquin, R., Garcia Ruiz, P. J. & Sanchez, M. P. 2008. Motor alterations are reduced in mice lacking the PARK2 gene in the presence of a human FTDP-17 mutant form of four-repeat tau. *J Neurol Sci*, 275, 139-44.
- Novak, I. 2012. Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxid Redox Signal*, 17, 794-802.

- Oksel, F., Tekgul, H., Genc, S., Ozyurek, R., Akalin, T. & Tututuncuoglu, S. 1999. A case of Lafora's disease associated with cardiac arrhythmia. *J Child Neurol*, 14, 745-6.
- Ortolano, S., Vieitez, I., Agis-Balboa, R. C. & Spuch, C. 2014. Loss of GABAergic cortical neurons underlies the neuropathology of Lafora disease. *Mol Brain*, 7, 7.
- Pederson, B. A., Turnbull, J., Epp, J. R., Weaver, S. A., Zhao, X., Pencea, N., Roach, P. J., Frankland, P. W., Ackerley, C. A. & Minassian, B. A. 2013. Inhibiting glycogen synthesis prevents Lafora disease in a mouse model. *Ann Neurol*, 74, 297-300.
- Pickart, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70, 503-33.
- Poels, J., Spasic, M. R., Callaerts, P. & Norga, K. K. 2009. Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays*, 31, 944-52.
- Puri, R. & Ganesh, S. 2012. Autophagy defects in Lafora disease: cause or consequence? *Autophagy*, 8, 289-90.
- Puri, R., Suzuki, T., Yamakawa, K. & Ganesh, S. 2009. Hyperphosphorylation and aggregation of Tau in laforin-deficient mice, an animal model for Lafora disease. *J Biol Chem*, 284, 22657-63.
- Ram, R., Mickelsen, D. M., Theodoropoulos, C. & Blaxall, B. C. 2011. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1765-80.
- Rao, S. N., Maity, R., Sharma, J., Dey, P., Shankar, S. K., Satishchandra, P. & Jana, N. R. 2010. Sequestration of chaperones and proteasome into Lafora bodies and proteasomal dysfunction induced by Lafora disease-associated mutations of malin. *Hum Mol Genet*, 19, 4726-34.
- Raththagala, M., Brewer, M. K., Parker, M. W., Sherwood, A. R., Wong, B. K., Hsu, S., Bridges, T. M., Paasch, B. C., Hellman, L. M., Husodo, S., Meekins, D. A., Taylor, A. O., Turner, B. D., Auger, K. D., Dukhande, V. V., Chakravarthy, S., Sanz, P., Woods, V. L., Jr., Li, S., Vander Kooi, C. W. & Gentry, M. S. 2015. Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease. *Mol Cell*, 57, 261-72.
- Rayman, M. P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356, 233-41.
- Reddy, P. H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W. O., Jr., Miller, G. & Tagle, D. A. 1998. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet*, 20, 198-202.
- Rehni, A. K. & Singh, T. G. 2013. Selenium induced anticonvulsant effect: a potential role of prostaglandin E(1) receptor activation linked mechanism. *J Trace Elem Med Biol*, 27, 31-9.
- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Perez-Mediavilla, A., Frechilla, D., Del Rio, J. & Garcia-Osta, A. 2009. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1721-32.
- Roach, P. J., Cheng, C., Huang, D., Lin, A., Mu, J., Skurat, A. V., Wilson, W. & Zhai, L. 1998. Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 9, 139-51.
- Roger, J. 1992. Progressive myoclonus epilepsies in childhood and adolescence. In: Roger, J. (ed.) *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*. London: Libbey.

- Roger, J., Pellissier, J. F., Bureau, M., Dravet, C., Revol, M. & Tinuper, P. 1983. [Early diagnosis of Lafora disease. Significance of paroxysmal visual manifestations and contribution of skin biopsy]. *Rev Neurol (Paris)*, 139, 115-24.
- Roma-Mateo, C., Aguado, C., Garcia-Gimenez, J. L., Ibanez-Cabellos, J. S., Seco-Cervera, M., Pallardo, F. V., Knecht, E. & Sanz, P. 2015a. Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease. *Mol Neurobiol*, 51, 932-46.
- Roma-Mateo, C., Aguado, C., Garcia-Gimenez, J. L., Knecht, E., Sanz, P. & Pallardo, F. V. 2015b. Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Free Radic Biol Med*, 88, 30-41.
- Saez, I., Duran, J., Sinadinos, C., Beltran, A., Yanes, O., Tevy, M. F., Martinez-Pons, C., Milan, M. & Guinovart, J. J. 2014. Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34, 945-55.
- Sakai, M., Austin, J., Witmer, F. & Trueb, L. 1970. Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology*, 20, 160-76.
- Schwarz, G. A. & Yanoff, M. 1965. Lafora's Disease. Distinct Clinico-Pathologic Form of Unverricht's Syndrome. *Arch Neurol*, 12, 172-88.
- Serratosa, J. M., Delgado-Escueta, A. V., Posada, I., Shih, S., Drury, I., Berciano, J., Zabala, J. A., Antunez, M. C. & Sparkes, R. S. 1995. The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q. *Hum Mol Genet*, 4, 1657-63.
- Serratosa, J. M., Gomez-Garre, P., Gallardo, M. E., Anta, B., De Bernabe, D. B., Lindhout, D., Augustijn, P. B., Tassinari, C. A., Malafosse, R. M., Topcu, M., Grid, D., Dravet, C., Berkovic, S. F. & De Cordoba, S. R. 1999. A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet*, 8, 345-52.
- Shandal, V., Veenstra, A. L., Behen, M., Sundaram, S. & Chugani, H. 2012. Long-term outcome in children with intractable epilepsy showing bilateral diffuse cortical glucose hypometabolism pattern on positron emission tomography. *J Child Neurol*, 27, 39-45.
- Sinadinos, C., Valles-Ortega, J., Boulan, L., Solsona, E., Tevy, M. F., Marquez, M., Duran, J., Lopez-Iglesias, C., Calbo, J., Blasco, E., Pumarola, M., Milan, M. & Guinovart, J. J. 2014. Neuronal glycogen synthesis contributes to physiological aging. *Aging Cell*, 13, 935-45.
- Singh, P. K., Singh, S. & Ganesh, S. 2013. Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) underlies increased glycogen levels, mTOR activation, and autophagy defects in Lafora disease. *Mol Biol Cell*, 24, 3776-86.
- Singh, S. & Ganesh, S. 2009. Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum Mutat*, 30, 715-23.
- Slack, F. J. & Ruvkun, G. 1998. A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. *Trends Biochem Sci*, 23, 474-5.
- Snead, O. C., 3rd, Banerjee, P. K., Burnham, M. & Hampson, D. 2000. Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci*, 20, 6218-24.
- Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcaniz, J. V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M. E., Garcia-Fojeda, B., Criado Garcia, O., Vilchez, D., Dominguez, J., Garcia-Rocha, M., Sanchez-Piris, M.,

- Aguado, C., Knecht, E., Serratosa, J., Guinovart, J. J., Sanz, P. & Rodriguez De Cordoba, S. 2008. Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet*, 17, 667-78.
- Stone, W. E. 1970. Convulsant actions of tetrazole derivatives. *Pharmacology*, 3, 367-70.
- Swinyard, E. A., Woodhead, J.H., White, H.S., And Franklin, M.R. 1989. Experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants. In: R.H. Levy, F. E. D., R.H. Mattson, B.S. Meldrum, And J.K. Penry (ed.) *Antiepileptic Drugs*. New York: Raven Press.
- Tagliabracci, V. S., Turnbull, J., Wang, W., Girard, J. M., Zhao, X., Skurat, A. V., Delgado-Escueta, A. V., Minassian, B. A., Depaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. 2007. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19262-6.
- Tassinari, C. A., Bureau-Paillas, M., Dalla Bernardina, B., Picornell-Darder, I., Mouren, M. C., Dravet, C. & Roger, J. 1978. [Lafora disease (author's transl)]. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin*, 8, 107-22.
- Tsuda, H., Katsumi, Y., Nakamura, M., Ikeda, A., Fukuyama, H., Kimura, J. & Shibasaki, H. 1995. [Cerebral blood flow and metabolism in Lafora disease]. *Rinsho Shinkeigaku*, 35, 175-9.
- Turnbull, J., Depaoli-Roach, A. A., Zhao, X., Cortez, M. A., Pencea, N., Tiberia, E., Piliguian, M., Roach, P. J., Wang, P., Ackerley, C. A. & Minassian, B. A. 2011. PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease. *PLoS Genet*, 7, e1002037.
- Turnbull, J., Epp, J. R., Goldsmith, D., Zhao, X., Pencea, N., Wang, P., Frankland, P. W., Ackerley, C. A. & Minassian, B. A. 2014. PTG protein depletion rescues malin-deficient Lafora disease in mouse. *Ann Neurol*, 75, 442-6.
- Turnbull, J., Wang, P., Girard, J. M., Ruggieri, A., Wang, T. J., Draginov, A. G., Kameka, A. P., Pencea, N., Zhao, X., Ackerley, C. A. & Minassian, B. A. 2010. Glycogen hyperphosphorylation underlies lafora body formation. *Ann Neurol*, 68, 925-33.
- Valles-Ortega, J., Duran, J., Garcia-Rocha, M., Bosch, C., Saez, I., Pujadas, L., Serafin, A., Canas, X., Soriano, E., Delgado-Garcia, J. M., Gruart, A. & Guinovart, J. J. 2011. Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med*, 3, 667-81.
- Van Eersel, J., Ke, Y. D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J. J., Gotz, J. & Ittner, L. M. 2010. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13888-93.
- Van Heycop Ten Ham, M. 1974. Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy. In: Vinken, P., Bruyn G, (ed.) *The Epilepsies. Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: North Holland
- Vernia, S., Rubio, T., Heredia, M., Rodriguez De Cordoba, S. & Sanz, P. 2009. Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One*, 4, e5907.
- Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Valles, J., Garcia-Fojeda, B., Criado-Garcia, O., Fernandez-Sanchez, E., Medrano-Fernandez, I., Dominguez, J., Garcia-Rocha, M., Soriano, E., Rodriguez De Cordoba, S. & Guinovart, J. J. 2007. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci*, 10, 1407-13.

- Villanueva, V., Alvarez-Linera, J., Gomez-Garre, P., Gutierrez, J. & Serratosa, J. M. 2006. MRI volumetry and proton MR spectroscopy of the brain in Lafora disease. *Epilepsia*, 47, 788-92.
- Wang, J., Stuckey, J. A., Wishart, M. J. & Dixon, J. E. 2002. A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J Biol Chem*, 277, 2377-80.
- Wick, R. & Byard, R. W. 2006. Mechanisms of unexpected and/or sudden death in Lafora disease. *Forensic Sci Int*, 163, 144-7.
- Wiley, J. C., Meabon, J. S., Frankowski, H., Smith, E. A., Schecterson, L. C., Bothwell, M. & Ladiges, W. C. 2010. Phenylbutyric acid rescues endoplasmic reticulum stress-induced suppression of APP proteolysis and prevents apoptosis in neuronal cells. *PLoS One*, 5, e9135.
- Woodbury, D. M. 1980. Convulsant drugs: mechanisms of action. *Adv Neurol*, 27, 249-303.
- Worby, C. A., Gentry, M. S. & Dixon, J. E. 2006. Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem*, 281, 30412-8.
- Worby, C. A., Gentry, M. S. & Dixon, J. E. 2008. Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J Biol Chem*, 283, 4069-76.
- Yata, K., Oikawa, S., Sasaki, R., Shindo, A., Yang, R., Murata, M., Kanamaru, K. & Tomimoto, H. 2011. Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse. *Brain Res*, 1410, 12-23.
- Yokoi, S., Nakayama, H. & Negishi, T. 1975. Biochemical studies on tissues from a patient with Lafora disease. *Clin Chim Acta*, 62, 415-23.
- Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS J*, 274, 630-58.
- Yun, H. M., Jin, P., Han, J. Y., Lee, M. S., Han, S. B., Oh, K. W., Hong, S. H., Jung, E. Y. & Hong, J. T. 2013. Acceleration of the development of Alzheimer's disease in amyloid beta-infused peroxiredoxin 6 overexpression transgenic mice. *Mol Neurobiol*, 48, 941-51.
- Zeng, L., Wang, Y., Baba, O., Zheng, P. & Liu, Y. 2012. Laforin is required for the functional activation of malin in endoplasmic reticulum stress resistance in neuronal cells. *FEBS J*, 279, 2467-78.
- Zhang, K. & Kaufman, R. J. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454, 455-62.
- Zhou, W., Bercury, K., Cumiskey, J., Luong, N., Lebin, J. & Freed, C. R. 2011. Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *J Biol Chem*, 286, 14941-51.

ANEXO



Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylenetetrazole

Ana M. García-Cabrero^{1,2}, Gentzane Sánchez-Elexpuru^{1,2}, José M. Serratosa^{1,2*} and Marina P. Sánchez^{1,2*}

¹ Laboratory of Neurology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain

Edited by:

Jesus Avila, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Spain

Reviewed by:

Matthew S. Gentry, University of Kentucky, USA
Tobias Engel, Royal College of Surgeons, Ireland

*Correspondence:

José M. Serratosa and Marina P. Sánchez, Laboratory of Neurology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain
e-mail: jmserratosa@fjd.es; msanchezg@fjd.es

Lafora disease is a rare form of inherited progressive myoclonus epilepsy caused by mutations in the *EPM2A* gene encoding laforin, or in the *EPM2B* gene, which encodes malin. It is characterized by the presence of polyglucosan inclusion bodies (Lafora bodies) in brain and other tissues. Genetically engineered mice lacking expression of either the laforin (*Epm2a*^{-/-}) or malin (*Epm2b*^{-/-}) genes display a number of neurological and behavioral abnormalities that resemble those found in patients suffering from Lafora disease; of these, both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice have shown altered motor activity, impaired motor coordination, episodic memory deficits, and different degrees of spontaneous epileptic activity. In this study, we analyze the sensitivity of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice to the convulsant drug pentylenetetrazol (PTZ), an antagonist of the γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor, commonly used to induce epileptic tonic-clonic seizures in laboratory animals. PTZ-induced epileptic activity, including myoclonic jerks and tonic-clonic seizures, was analyzed in 2 age groups of mice comprising representative samples of young adult and aged mice, after administration of PTZ at sub-convulsive and convulsive doses. *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice showed a lower convulsive threshold after PTZ injections at sub-convulsive doses. A lower convulsive threshold and shorter latencies to develop epileptic seizures were observed after PTZ injections at convulsive doses. Different patterns of generalized seizures and of discharges were observed in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice. *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice present an increased sensitivity to the convulsant agent PTZ that may reflect different degrees of increased GABA_A receptor-mediated hyperexcitability.

Keywords: Lafora disease, epilepsy, *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice, PTZ, seizure threshold

INTRODUCTION

Lafora disease (LD) is a rare form of inherited progressive myoclonus epilepsy (OMIM#254780; ORPHA501). Recessive mutations in either the *EPM2A* gene encoding a dual-specificity phosphatase known as laforin (OMIM 607566) (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999) or in the *EPM2B/NHLRC1* gene encoding malin (OMIM 608072), an E3 ubiquitin ligase (Chan et al., 2003; Gentry et al., 2005; Gomez-Abad et al., 2005; Singh et al., 2005, 2006) are responsible for the disease, although the existence of a third, minor locus has also been postulated (Chan et al., 2004).

Patients with LD develop progressive myoclonus epilepsy that usually starts in adolescence and includes absence, visual, myoclonic, and tonic-clonic seizures accompanied by rapid neurologic degeneration, including ataxia, dementia, dysarthria, amaurosis, respiratory failure, and a final vegetative state and death, usually within 10 years of onset (Lafora, 1911; Van Heycop Ten Ham, 1974; Berkovic et al., 1986, 1991; Roger et al., 1992; Acharya et al., 1995). The principal pathologic feature of LD is the presence of periodic acid-Schiff (PAS)-positive intracellular inclusions of polyglucosans (Lafora bodies) located mainly in the

brain, the skeletal muscle, the heart, and the liver (Lafora, 1911; Lafora and Glueck, 1911; Harriman et al., 1955; Yokoi et al., 1968; Sakai et al., 1970; Carpenter and Karpati, 1981; Berkovic et al., 1986). Currently, no preventive or curative therapies exist for LD.

Different mouse models have been generated by disrupting either the *Epm2a* (Ganesh et al., 2002) or the *Epm2b* gene (Depaoli-Roach et al., 2010; Turnbull et al., 2010; Valles-Ortega et al., 2011; Criado et al., 2012). Of these, the *Epm2a*^{-/-} mouse line generated by Ganesh et al. (2002) displays many of the neurological and behavioral abnormalities found in LD patients, including neuronal degeneration and the development of Lafora bodies in different organs including heart, liver, muscle, and a variety of brain regions such as hippocampus, cerebral cortex, thalamus, cerebellum, and brainstem (Ganesh et al., 2002). In addition, the *Epm2b*^{-/-} mouse line previously generated by our group (Criado et al., 2012) also shows substantial neurological abnormalities that correlated with the detection of Lafora bodies in the same brain regions as those of the *Epm2a*^{-/-} mouse line (Criado et al., 2012). Of those neurological abnormalities, both laforin-deficient and malin-deficient mouse lines showed altered

motor activity, impaired motor coordination, episodic memory deficits, and different degrees of spontaneous epileptic activity, such as spontaneous single spikes, polyspikes and spike-wave and polyspike-wave complexes correlating with myoclonic jerks (Ganesh et al., 2002; Criado et al., 2012; García-Cabrero et al., 2012). *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice had spontaneous tonic-clonic seizures, although the *Epm2b*^{-/-} mice did not display EEG correlates (García-Cabrero et al., 2012).

Here we analyze the responses of both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice to the administration of the epileptogenic agent pentylenetetrazole (PTZ). PTZ is widely used for the study of epileptiform activity in laboratory animals (Vernadakis and Woodbury, 1969; Reinhard and Reinhard, 1977; Swinyard et al., 1989), and is also used routinely to test antiepileptic drugs (Swinyard et al., 1989). PTZ is an antagonist of the type A receptor of γ -aminobutyric acid (GABA_A) (Stone, 1970). As with other GABA_A antagonists, administration of low doses of PTZ can result in absence seizures in animal models (Snead et al., 2000), whereas higher doses result in generalized tonic-clonic seizures (Woodbury et al., 1980; Panagopoulos et al., 1998; Coimbra et al., 2001a,b; Erakovic et al., 2001; Eloqayli et al., 2003). In this study, we used PTZ at both sub-convulsive and convulsive doses to analyze seizure thresholds in an attempt to elucidate the molecular mechanisms underlying altered neuronal excitability in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice and to further evaluate novel therapeutic strategies to treat epileptic symptoms. PTZ induces seizure development shortly after injection (Pitkanen et al., 2006), with reversible effects and low toxicity at convulsive doses (Velisek, 2006), whereas other seizure inducing agents such as methionine sulfoximine or kainate (Dudek et al., 2006; Eid et al., 2008; Cloix and Hevor, 2009), induce development of seizures with long pre-convulsive periods of several hours, and others produce therapy-resistant seizures, e.g., strichnine (Löscher, 1997). This makes PTZ the most appropriate agent for seizure monitoring in our models.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

Generation of *Epm2a*^{-/-} mutant mice (Ganesh et al., 2002) was performed by targeted deletion of the fourth exon of the *Epm2a* gene (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999), which encodes the dual-specificity phosphatase domain that is critical for the function of laforin. Constitutive *Epm2b*^{-/-} mutant mice were generated by targeting deletion of the unique exon encoding malin, as previously described (Criado et al., 2012). The genetic background of null-mouse lines used in the study was a mix of 129Sv:C57BL/6J (25%:75%). The mice were kept at the IIS-Fundación Jiménez Jiménez Díaz animal facility and were maintained on a 12:12-h light/dark cycle under constant temperature (23°C) with free access to regular food and water *ad libitum*. Two groups of homozygous animals aged 4–8 and 9–23 months (representative samples of young adult and aged mice) were analyzed for each experiment. The experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles and the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, and were approved by the IIS-Fundación Jiménez Díaz ethical review board.

HISTOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The animals were anesthetized with a mixture of medetomidine (Domitor, Pfizer, Espoo, Finland), ketamine (Ketolar, Pfizer, Espoo, Finland), and sterile water (1:1.5:1.5) and transcardially perfused with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde. The animals' brains were removed, postfixed overnight at 4°C, dehydrated in graded ethanol solutions, and embedded in paraffin. They were then sectioned in serial arrays of 7- μ m-thick sections, deparaffinized at 60°C, and stored at room temperature until use. For PAS staining, coronal sections were processed as previously described (Mitsuno et al., 1999), and counterstained with hematoxylin solution. For immunohistochemistry, contiguous PAS-stained sections were rehydrated and incubated in 1.5% (vol/vol) H₂O₂ in methanol for 20 min at room temperature to inactivate endogenous peroxidase. Sections were then placed in blocking buffer for 60 min at room temperature and incubated for 3 days at 4°C with anti-ubiquitin antibody (Dako, Glostrup, Denmark). Subsequently, the sections were treated with anti-rabbit biotinylated secondary antibody and stained using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immunoreactivity was developed with diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark), and sections were counterstained with hematoxylin solution, dehydrated, and covered with DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).

PTZ TREATMENT

PTZ (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) was dissolved in sterile water and injected intraperitoneally at different doses as a single injection. The doses administered were those known to be sub-convulsive (30 mg/kg) (Erakovic et al., 2001) and convulsive (50 mg/kg) (Erakovic et al., 2001; Eloqayli et al., 2003) for control mice. As described previously, a dose of 50 mg/kg induces seizures in 50% of control animals (Shitak et al., 2006). After drug administration, PTZ-induced myoclonic jerks and seizure monitoring was performed in 16–36 mice per group using visual blinded observation over a period of 45 min. The percentages of mice displaying myoclonic jerks and generalized tonic-clonic seizures were recorded in 3 groups of control, *Epm2a*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} mice at 4–8 and 9–23 months of age. Following injection of PTZ, mice displayed periods of immobility and overt evidence of convulsive activity which included hyperactivity, twitching, and hyperextension of the limbs that at times progresses to generalized tonic-clonic seizures. We recorded the percentages of PTZ injected mice that present both muscular jerks, which usually started within a few minutes of PTZ injection, and generalized tonic-clonic seizures. To assess for the presence of EEG correlates, twelve mice chosen at random as representative samples of these 3 groups at 4–8 and 9–23 months underwent surgery and analysis by video-EEG after PTZ injection at convulsive doses. EEG recordings of operated mice revealed the existence of isolated spikes and spike-waves that correlate with muscular jerks. Generalized tonic-clonic seizures with low-frequency (3–6 Hz) spike-wave correlates were also observed in EEGs. Latency—or time between injection and onset of seizures—and seizure length were also analyzed for those mice treated with 50 mg/kg PTZ. In addition to measuring epileptic activity, PTZ-induced lethality was also analyzed for each drug dose.

VIDEO-ELECTROENCEPHALOGRAPHIC (EEG) RECORDING

Procedures for implantation of intracranial electrodes and video-EEG recording have been previously described (Criado et al., 2012; García-Cabrero et al., 2012). Briefly, custom-made stainless-steel screw electrodes were fixed to the skulls of anesthetized animals under a mixture of medetomidine, ketamine and sterile water (1:1.5:1.5). Two monopolar epidural electrodes were implanted symmetrically over the frontal cortex in front of bregma, whereas 2 ground and reference electrodes were positioned posterior to lambda. After a 4-day recovery period, synchronized video-EEG activity was recorded using computer-based systems (Easy EEG 2.1, Cadwell, CA, USA and Natus Neurowork EEG, Natus Medical Inc., San Carlos, CA, USA) while the mice moved freely.

STATISTICAL ANALYSIS

Values are given as means \pm standard error of means (SEM) or percentages. Differences between groups were analyzed by two-tailed Student's *t*-test or Chi-square (Graph-Pad Prism 2.0). Statistical significance was considered to be reached at $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

RESULTS

PRESENCE OF LAFORA BODIES IN *Epm2a*^{-/-} AND *Epm2b*^{-/-} MICE

As in previous descriptions, Lafora inclusions were abundant in several brain regions of the *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice, including cerebral cortex, hippocampus, basal ganglia, thalamus, cerebellum, and brainstem (Criado et al., 2012; García-Cabrero et al., 2012). Representative examples of neurons of Layers IV-V of the cortex exhibiting PAS-positive Lafora aggregates in cell bodies of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} at 17 months of age are shown in **Figures 1A,B**, respectively. Intracellular inclusions immunostained for ubiquitin were also found in the same regions as PAS-positive inclusions (**Figures 1C,D**).

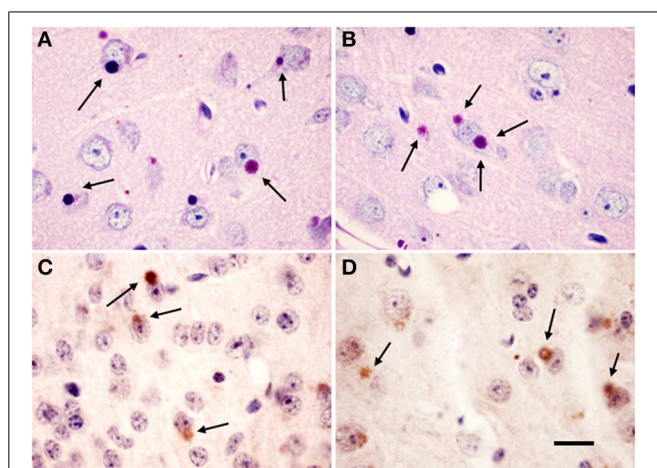


FIGURE 1 | Lafora bodies in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice brains.

Citoplasmic polyglucosan inclusions (arrows) positive for periodic acid-Schiff staining (PAS) (**A,B**) in layer V of the cerebral cortex, and immunostained for ubiquitin (**C,D**) in Layer IV (**C**) and IV-V (**D**) of cerebral cortex of *Epm2a*^{-/-} (**A,C**) and *Epm2b*^{-/-} (**B,D**) mice at 17 months of age. Scale bar = 20 μ m.

ANALYSIS OF PTZ-INDUCED MYOCLONUS, GENERALIZED TONIC-CLONIC SEIZURES, AND LETHALITY IN MICE LACKING LAFORIN OR MALIN

Following injection of PTZ, control mice displayed periods of immobility and overt evidence of convulsive activity which included hyperactivity, twitching, and hyperextension of the limbs, later progressing to generalized tonic-clonic seizures. We established scores for the presence of both myoclonic jerks which usually started within a few minutes of PTZ injection, and tonic-clonic seizures. EEG recordings of operated mice revealed the existence of isolated spikes and spike-wave correlates. At subconvulsive doses, the percentage of mutant mice showing myoclonic jerks was higher than that of control mice (**Figure 2A**). Thus, at this dose, 45% of *Epm2a*^{-/-} and 50% of *Epm2b*^{-/-} mice at 4–8 months displayed myoclonic jerks, compared to only 7% of age-matched control mice. In the 9-to-23-month mice group, myoclonic jerks were present in 67% of *Epm2a*^{-/-} and 75% of *Epm2b*^{-/-}, compared to only 22% of control mice. When the induction of myoclonic jerks was analyzed at a higher dose of PTZ (50 mg/kg), no major differences were observed between controls and *Epm2a*^{-/-} or *Epm2b*^{-/-} mice (**Figure 2B**). These results indicate that a sub-convulsive dose of the epileptogenic drug PTZ induces the appearance of myoclonic jerks more easily in both young and old mice lacking the expression of either laforin or malin proteins, as compared to age-matched controls. Although both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice trend to present more myoclonic jerks with age, no statistical differences were found between young and older mice. After administration of subconvulsive doses of PTZ in control, *Epm2a*^{-/-}, or *Epm2b*^{-/-} mice at 4–8 months of age, no generalized tonic-clonic seizures were observed (**Figure 2C**). However, in the oldest group, a small proportion of mice displayed seizures, though no significant differences were recorded between control and mutant mice (6% control, 13% *Epm2a*^{-/-}, and 3% *Epm2b*^{-/-}) (**Figure 2C**). As expected, a convulsive PTZ dose at 4–8 months of age induced tonic-clonic seizures in 50% of control mice (**Figure 2D**). Interestingly, this percentage was notably increased for both *Epm2a*^{-/-} (80%) and *Epm2b*^{-/-} (78%) mice (**Figure 2D**). Similar results were obtained for *Epm2a*^{-/-} (78%) mice at 9–23 months, whereas no major differences between control and *Epm2b*^{-/-} mice were noticed at this age (**Figure 2D**). Lethality thresholds were not affected in either *Epm2a*^{-/-} or *Epm2b*^{-/-} mice at any PTZ dose as compared to age-matched controls (data not shown).

PTZ-INDUCED SEIZURE LATENCY AND LENGTH

Latency, or the time elapsed between injection of a convulsive dose of PTZ (50 mg/kg) and tonic-clonic seizure appearance, was recorded for controls, *Epm2a*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} mice. Mutant mice in both age ranges showed statistically significant reductions in seizure latency when compared to age-matched control mice (**Figure 3A**). Additionally, the length of PTZ-induced seizures in the *Epm2b*^{-/-} model at 4–8 months of age was significantly increased (**Figure 3B**). The length of PTZ-induced seizures in the *Epm2a*^{-/-} mice at 9–23 months of age was also increased, although no significant differences were observed between old *Epm2a*^{-/-} or *Epm2b*^{-/-} mice and age-matched controls.

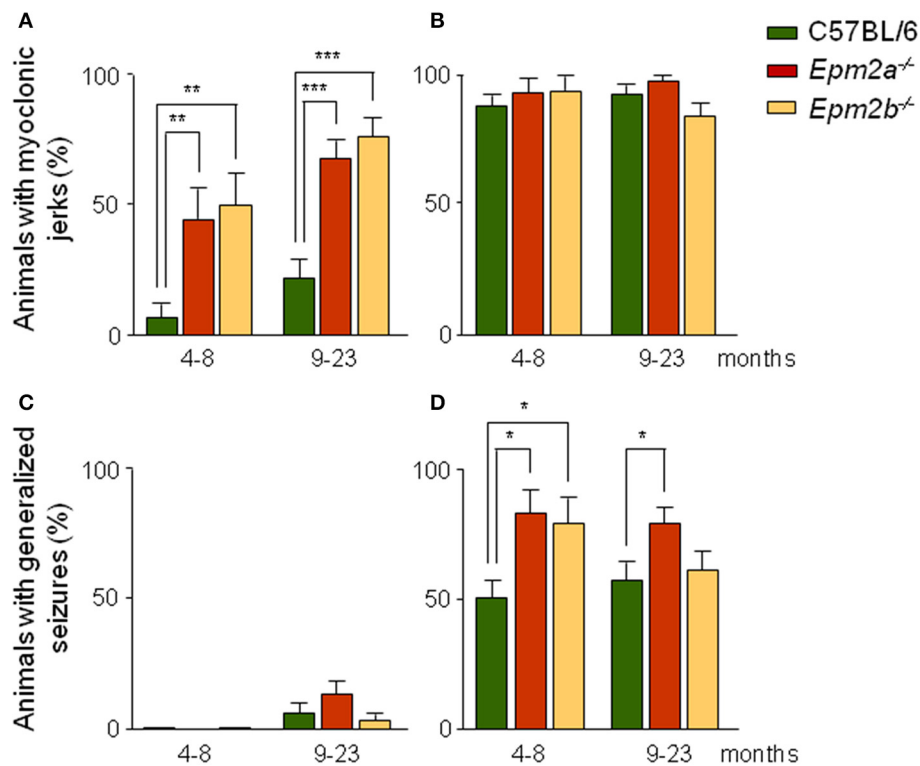


FIGURE 2 | Increased sensitivity of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} models to the chemoconvulsant agent PTZ. Two different age groups (4–8 and 9–23 months) of control, *Epm2a*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} mice were injected intraperitoneally with 30 (A,C) and 50 mg/kg of

PTZ (B,D) and the percentages of mice showing PTZ-induced myoclonus (A,B), and generalized seizures (C,D) were recorded. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001, Chi-square (*n* = 16–36 mice per group at each PTZ dose).

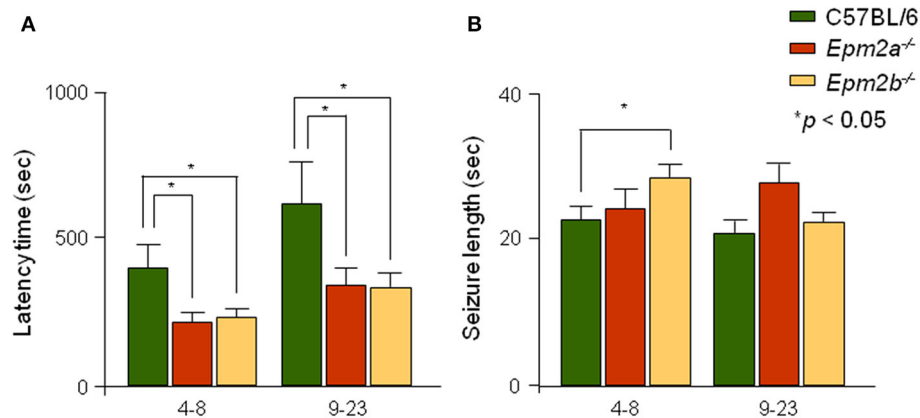


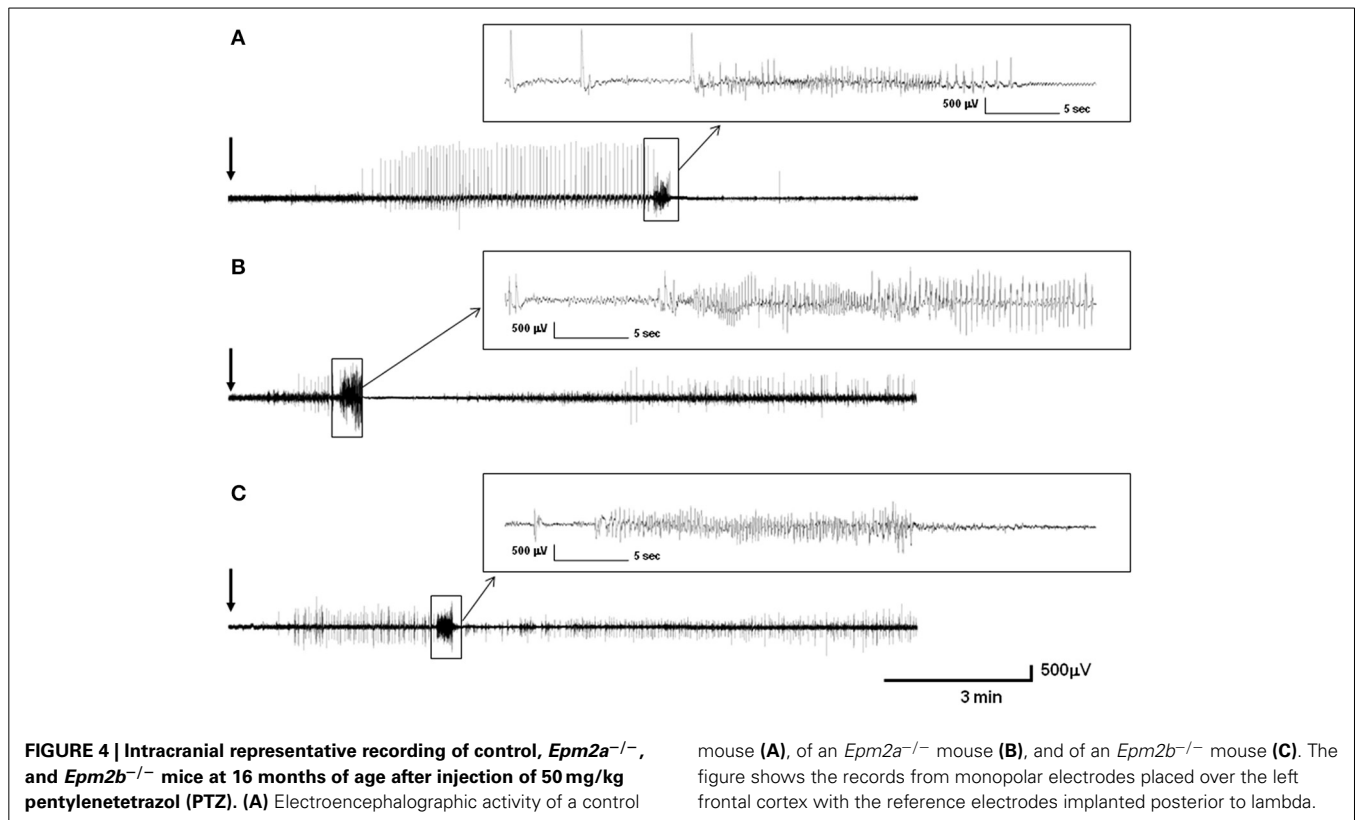
FIGURE 3 | Analysis of seizure latency and length of PTZ-induced generalized seizures in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice. Mice within 2 different age spans (4–8 and 9–23 months) were injected with a convulsive dose of PTZ (50 mg/kg). (A) The time interval between drug

administration and development of generalized tonic-clonic seizures and (B) the seizure length were measured. Data are presented as mean ± s.e.m. Student's *t*-test was performed for statistical evaluation. **p* < 0.05 (*n* = 12–25).

VIDEO-EEG RECORDINGS OF PTZ-INDUCED SEIZURES IN CONTROL, *Epm2a*^{-/-}, AND *Epm2b*^{-/-} MICE AT 16 MONTHS OF AGE

Injections of PTZ at convulsive doses in control mice produced periods of immobility followed by twitching and hyperextension

of the limbs, further progressing to generalized tonic-clonic seizures. Intracranial EEG recordings of control, *Epm2a*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} mice showed different specific patterns of discharges after 50-mg/kg PTZ injections. Thus, operated control mice



(representative example is shown in **Figure 4A**) showed a pattern of discharges starting 1 min and 19 s after PTZ injection, with isolated spike and spike-wave discharges alternating with immobility periods during 3 min. At this point, rhythmic isolated spike and spike-wave discharges with muscular jerk correlates were shown over a period of 5 min; these evolved to generalized tonic-clonic seizures with low-frequency (3–6 Hz) spike-wave correlates lasting 22 s. The tonic-clonic seizure began with a tonic phase that was followed by a clonic stage and an after-seizure period of immobility. A representative EEG recording of an *Epm2a*^{-/-} mouse after PTZ injection (**Figure 4B**) displayed a significantly shorter period of time (1 min and 30 s) before a brief 1-min initial stage of irregular twitches and myoclonus that correlated with spike and spike-wave complexes and that evolved into a tonic-clonic seizure lasting 29 s. This seizure started with a tonic phase lasting 14 s with hyperextension of the limbs and was followed by a 4-s period of clonic stage and a 24-s period of tonic hind-limb extension. The first 11 s of this tonic phase presented with spike-wave complex correlates and concluded with a 13-s period of non-neuronal activity. A representative example of EEG recording of an *Epm2b*^{-/-} mice (**Figure 4C**) showed a 1-min period of normal activity after PTZ injection, which was followed by myoclonus, muscular jerks, and twitches with EEG correlates of spikes and spike-wave and polyspike-wave complexes over a period of 3 min, preceding a generalized tonic-clonic seizure lasting 22 s. This seizure started with a 3-s tonic phase with hyperextension of the limbs that was followed by a prominent tonic-clonic stage lasting 19 s. The post-seizure period of non-neuronal

activity was almost absent in the *Epm2b*^{-/-} model while post-ictal discharges with myoclonic correlates started suddenly in this model.

DISCUSSION

Although a great effort has been devoted to understanding the basis of the formation of Lafora bodies and their relationship to autophagy and alterations in glycogen metabolism (Gentry et al., 2007; Tagliabracci et al., 2008; Aguado et al., 2010; Criado et al., 2012), the relationships between the development of Lafora bodies and the induction of abnormal electroencephalographic activity remain unknown. Lafora disease patients present a distinctive EEG pattern characterized by slowing of background activity with recurrent epileptiform discharges: 3–6 Hz spikes/polyspikes, with or without slow waves (Van Heycop Ten Ham, 1974), similar to that observed in spontaneous seizures developed by *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice (Ganesh et al., 2002; García-Cabrero et al., 2012).

It has been previously reported that the lack of expression of malin protein in a different *Epm2b*^{-/-} mice model (Valles-Ortega et al., 2011) resulted in an increase in the susceptibility to pharmacologically induced hippocampal seizures using the epileptogenic kainic acid. PTZ is a widely used chemical for the induction of generalized epilepsy. It has also been extensively used to test antiepileptic drugs on laboratory animals (Stone, 1970). Although animal models based on PTZ are widely used, the mechanism by which PTZ elicits its action is not very well understood. At the molecular level, a generally

accepted mechanism of PTZ is non-competitive antagonism of the gamma-aminobutyric acid GABA_A receptor complex. Additionally, alterations in voltage-dependent calcium and potassium channels and changes in the serotonergic and in the NMDA receptor-mediated glutamate neurotransmission are also generated after PTZ treatment. Treatment with PTZ in mice induces a wide range of responses, from mild convulsions to generalized seizures, all of them as a result of an excess of activation of neurons located in the frontal cortex, the amygdala, the cerebellum, the brainstem, and other regions of the brain.

In this study we have undertaken a systematic evaluation of PTZ-induced seizure responses in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice. Both models present a significantly increased sensitivity to PTZ that is more noticeable in the presence of myoclonus at sub-convulsive doses. Although both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice trend to present more myoclonic jerks with age, no statistical differences were found between young and older mice. At convulsive doses, the percentage of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice showing generalized seizures was significantly increased, as was seizure length, while the latency time to the appearance of these seizures experienced a statistically significant reduction when compared to age-matched controls. Although old *Epm2b*^{-/-} mice trended to be more resistance to PTZ than young animals, no significant differences were found between all aged groups. It has been widely reported that number of Lafora bodies increases with age in brain of *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice (Ganesh et al., 2002; Criado et al., 2012; García-Cabrero et al., 2012). Moreover, alterations in motor coordination, activity impairment and memory deficits progressively increase with age in both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice (García-Cabrero et al., 2012), probably reflecting the increased accumulation of Lafora bodies in multiple brain regions. However, myoclonus and seizures were observed in both mutant mouse strains regardless of age. Thus, it seems likely that development of Lafora bodies does not interfere with the induction of abnormal electroencephalographic activity in our mouse models.

The lack of laforin and malin expression may induce some aberrant activity of neuronal networks, resulting in increased GABA_A receptor-mediated hyperexcitability. EEG records of PTZ-induced seizures in *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice showed the presence of characteristic patterns of discharges. Both *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice display a shorter period of latency with irregular spike and spike-wave discharges before the appearance of the tonic-clonic seizure as compared to age-matched controls. Moreover, post-ictal discharges with myoclonic correlates started suddenly in both models. This behavior may reflect the existence of alterations in the GABAergic neurotransmission which could be involved in the generation of epileptic traits.

Overall, our results show that mice lacking expression of either laforin or malin display different degrees of increased GABA_A receptor-mediated hyperexcitability after administration of the epileptogenic agent PTZ. Our *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} models may assist in understanding the way laforin and malin mutations regulate excitotoxic damage and in assaying novel agents aimed at reducing epileptic seizures in this devastating disease.

ACKNOWLEDGMENT

We thank to Dr. José Luis Sarasa for supervising neuropathological analysis. We also thank Oliver Shaw for editing assistance. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-18586 to José M. Serratos), from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI13/00865) from the Spanish Ministry of Health, and by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, Madrid, Spain. Ana M. García-Cabrero and Gentzane Sánchez-Elexpuru were supported by fellowships from the Fundación Conchita Rábago.

REFERENCES

- Acharya, J. N., Satishchandra, P., and Shankar, S. K. (1995). Familial progressive myoclonus epilepsy: clinical and electrophysiologic observations. *Epilepsia* 36, 429–434. doi: 10.1111/j.1528-1157.1995.tb00482.x
- Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., et al. (2010). Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2867–2876. doi: 10.1093/hmg/ddq190
- Berkovic, S. F., Andermann, F., Carpenter, S., and Wolfe, L. S. (1986). Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 315, 296–305. doi: 10.1056/NEJM198607313150506
- Berkovic, S. F., So, N. K., and Andermann, F. (1991). Progressive myoclonus epilepsies: clinical and neurophysiological diagnosis. *J. Clin. Neurophysiol.* 8, 261–274. doi: 10.1097/00004691-199107010-00003
- Carpenter, S., and Karpatis, G. (1981). Ultrastructural findings in Lafora disease. *Ann. Neurol.* 10, 63–64. doi: 10.1002/ana.410100116
- Chan, E. M., Bulman, D. E., Paterson, A. D., Turnbull, J., Andermann, E., Andermann, F., et al. (2003). Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J. Med. Genet.* 40, 671–675. doi: 10.1136/jmg.40.9.671
- Chan, E. M., Omer, S., Ahmed, M., Bridges, L. R., Bennett, C., Scherer, S. W., et al. (2004). Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology* 63, 565–567. doi: 10.1212/01.WNL.0000133215.65836.03
- Cloix, J. F., and Hevor, T. (2009). Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Curr. Med. Chem.* 16, 841–853. doi: 10.2174/092986709787549316
- Coimbra, N. C., Castro-Souza, C., Segato, E. N., Nora, J. E., Herrero, C. F., Tedeschi-Filho, W., et al. (2001a). Post-ictal analgesia: involvement of opioid, serotonergic and cholinergic mechanisms. *Brain Res.* 888, 314–320. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03103-6
- Coimbra, N. C., Freitas, R. L., Savoldi, M., Castro-Souza, C., Segato, E. N., Kishi, R., et al. (2001b). Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of mu(1)-opioid receptor. *Brain Res.* 903, 216–221. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02366-6
- Criado, O., Aguado, C., Gayerre, J., Duran-Trio, L., García-Cabrero, A. M., Vernia, S., et al. (2012). Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1521–1533. doi: 10.1093/hmg/ddr590
- Depaoli-Roach, A. A., Tagliabracchi, V. S., Segvich, D. M., Meyer, C. M., Irimia, J. M., and Roach, P. J. (2010). Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J. Biol. Chem.* 285, 25372–25381. doi: 10.1074/jbc.M110.148668
- Dudek, F., Clark, S., Williams, P. A., and Grabenstatter, H. L. (2006). “Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy,” in *Models of Seizures and Epilepsy*, eds A. Pitkänen, P. A. Schwartzkroin, and S. L. Moshé (Burlington, MA: Elsevier Academic Press), 415–432.
- Eid, T., Ghosh, A., Wang, Y., Beckstrom, H., Zaveri, H. P., Lee, T. S., et al. (2008). Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain* 131, 2061–2070. doi: 10.1093/brain/awn133
- Eloqayli, H., Dahl, C. B., Gotestam, K. G., Unsgard, G., Hadidi, H., and Sonnewald, U. (2003). Pentylenetetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J. Neurochem.* 85, 1200–1207. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01781.x
- Erakovic, V., Zupan, G., Varljen, J., Laginja, J., and Simonic, A. (2001). Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol

- kindling and pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res.* 43, 165–173. doi: 10.1016/S0920-1211(00)00197-2
- Ganesh, S., Delgado-Escueta, A. V., Sakamoto, T., Avila, M. R., Machado-Salas, J., Hoshii, Y., et al. (2002). Targeted disruption of the *Epm2a* gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1251–1262. doi: 10.1093/hmg/11.11.1251
- García-Cabrero, A. M., Marinas, A., Guerrero, R., De Cordoba, S. R., Serratos, J. M., and Sanchez, M. P. (2012). Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 413–421. doi: 10.1097/NEN.0b013e318253350f
- Gentry, M. S., Downen, R. H. 3rd., Worby, C. A., Mattoo, S., Ecker, J. R., and Dixon, J. E. (2007). The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *J. Cell Biol.* 178, 477–488. doi: 10.1083/jcb.200704094
- Gentry, M. S., Worby, C. A., and Dixon, J. E. (2005). Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8501–8506. doi: 10.1073/pnas.0503285102
- Gomez-Abad, C., Gomez-Garre, P., Gutierrez-Delgado, E., Saygi, S., Michelucci, R., Tassinari, C. A., et al. (2005). Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology* 64, 982–986. doi: 10.1212/01.WNL.0000154519.10805.F7
- Harriman, D. G., Millar, J. H., and Stevenson, A. C. (1955). Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain* 78, 325–349. doi: 10.1093/brain/78.3.325
- Lafora, G. R. (1911). Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen; zugleich Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 205, 294–303.
- Lafora, G. R., and Glueck, B. (1911). Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 6, 1–14. doi: 10.1007/BF02863929
- Löschner, W. (1997). Animal models of intractable epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 53, 239–258. doi: 10.1016/S0304-0082(97)00035-X
- Minassian, B. A., Lee, J. R., Herbrick, J. A., Huizenga, J., Soder, S., Mungall, A. J., et al. (1998). Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 20, 171–174. doi: 10.1038/2470
- Mitsuno, S., Takahashi, M., Gondo, T., Hoshii, Y., Hanai, N., Ishihara, T., et al. (1999). Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopical characteristics of periodic acid-Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol.* 98, 31–38. doi: 10.1007/s004010051048
- Panagopoulos, N. T., Kazanis, E., Sotiriou, E., Papanastasiou, P., and Matsokis, N. A. (1998). Effect of the pentylenetetrazole (PTZ) induced seizures on the gabaergic system in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 10, 48.
- Pitkanen, A., Clark S., Williams P. A., and Moshé, S. L. (2006). *Models of Seizures and Epilepsy*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Reinhard, J. F., and Reinhard, J. F. J. (1977). “Experimental evaluation of anti-convulsants,” in *Anticonvulsants*, ed J. A. Vida (New York, NY: Academic Press), 57–111.
- Roger, J., Genton, P., and Bureau M., and Dravet, C. (1992). “Progressive myoclonus epilepsies in childhood and adolescence,” in *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*, eds J. Roger, M. Bureau, C. Dravet, F. E. Dreifuss, A. Perret and P. Wolf (London: John Libbey), 381–400.
- Sakai, M., Austin, J., Witmer, F., and Trueb, L. (1970). Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology* 20, 160–176. doi: 10.1212/WNL.20.2.160
- Serratos, J. M., Gomez-Garre, P., Gallardo, M. E., Anta, B., De Bernabe, D. B., Lindhout, D., et al. (1999). A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8, 345–352. doi: 10.1093/hmg/8.2.345
- Shitak, R., Sahai, A. K., Hota, D., and Chakrabarti, A. (2006). Anti-seizure efficacy of nimodipine in pentylenetetrazole and kainic acid combined seizure models in mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 50, 265–272.
- Singh, S., Sethi, I., Francheschetti, S., Riggio, C., Avanzini, G., Yamakawa, K., et al. (2006). Novel NHLRC1 mutations and genotype-phenotype correlations in patients with Lafora’s progressive myoclonic epilepsy. *J. Med. Genet.* 43, e48. doi: 10.1136/jmg.2005.039479
- Singh, S., Suzuki, T., Uchiyama, A., Kumada, S., Moriyama, N., Hirose, S., et al. (2005). Mutations in the NHLRC1 gene are the common cause for Lafora disease in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 50, 347–352. doi: 10.1007/s10038-005-0263-7
- Snead, O. C. 3rd., Banerjee, P. K., Burnham, M., and Hampson, D. (2000). Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J. Neurosci.* 20, 6218–6224.
- Stone, W. E. (1970). Convulsant actions of tetrazole derivatives. *Pharmacology* 3, 367–370. doi: 10.1159/000136093
- Swinyard, E. A., Woodhead, J. H., White, H. S., and Franklin, M. R. (1989). “Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants,” in *Antiepileptic drugs*, eds R. H. Levy, F. E. Dreifuss, R. H. Mattson, B. S. Meldrum, and J. K. Penry (New York, NY: Raven Press), 85–102.
- Tagliabracci, V. S., Girard, J. M., Segvich, D., Meyer, C., Turnbull, J., Zhao, X., et al. (2008). Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J. Biol. Chem.* 283, 33816–33825. doi: 10.1074/jbc.M807428200
- Turnbull, J., Wang, P., Girard, J. M., Ruggieri, A., Wang, T. J., Draginov, A. G., et al. (2010). Glycogen hyperphosphorylation underlies lafora body formation. *Ann. Neurol.* 68, 925–933. doi: 10.1002/ana.22156
- Valles-Ortega, J., Duran, J., García-Rocha, M., Bosch, C., Saez, I., Pujadas, L., et al. (2011). Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol. Med.* 3, 667–681. doi: 10.1002/emmm.201100174
- Van Heycop Ten Ham, M. W. (1974). “Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy,” in *The Epilepsies, Handbook of Clinical Neurology*, eds P. J. Vinken and G. W. Bruyn (North-Holland, Amsterdam), 382–422.
- Velisek, L. (2006). “Models of chemically-induced acute seizures,” in *Models of Seizures and Epilepsy*, (Burlington, MA: Elsevier Academic Press), 127–152.
- Vernadakis, A., and Woodbury, D. M. (1969). The developing animal as a model. *Epilepsia* 10, 163–178. doi: 10.1111/j.1528-1157.1969.tb03841.x
- Woodbury, D. M., Glaser, G. H., Penry, J. K., and Woodbury, D. M. (1980). “Convulsant drugs: mechanism of action,” in *Advances in Neurology*, (New York, NY: Raven Press), 249–303.
- Yokoi, S., Austin, J., Witmer, F., and Sakai, M. (1968). Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases. *Arch. Neurol.* 19, 15–33. doi: 10.1001/archneur.1968.00480010033002

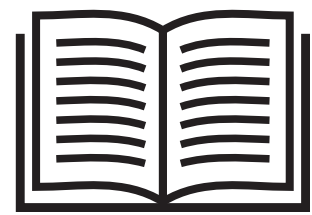
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 13 June 2014; accepted: 27 August 2014; published online: 12 September 2014.

Citation: García-Cabrero AM, Sánchez-Elexpuru G, Serratos JM and Sánchez MP (2014) Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylenetetrazole. *Front. Neurosci.* 8:291. doi: 10.3389/fnins.2014.00291

This article was submitted to *Neurodegeneration*, a section of the journal *Frontiers in Neuroscience*.

Copyright © 2014 García-Cabrero, Sánchez-Elexpuru, Serratos and Sánchez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Sodium selenate treatment improves symptoms and seizure susceptibility in a malin-deficient mouse model of Lafora disease

*†Gentzane Sánchez-Elexpuru, *†José M. Serratosa, and *†Marina P. Sánchez

Epilepsia, **(*):1–9, 2017
doi: 10.1111/epi.13656



Gentzane Sánchez-Elexpuru is a doctoral student at the IIS-Jiménez Díaz Foundation in Madrid, Spain.

SUMMARY

Objective: To search for new therapies aimed at ameliorating the neurologic symptoms and epilepsy developing in patients with Lafora disease.

Methods: Lafora disease is caused by loss-of-function mutations in either the *EPM2A* or *EPM2B* genes. *Epm2a*^{−/−} and *Epm2b*^{−/−} mice display neurologic and behavioral abnormalities similar to those found in patients. Selenium is a potent antioxidant and its deficiency has been related to the development of certain diseases, including epilepsy. In this study, we investigated whether sodium selenate treatment improved the neurologic alterations and the hyperexcitability present in the *Epm2b*^{−/−} mouse model.

Results: Sodium selenate ameliorates some of the motor and memory deficits and the sensitivity observed with pentylentetrazol (PTZ) treatments in *Epm2b*^{−/−} mice. Neuronal degeneration and gliosis were also diminished after sodium selenate treatment.

Significance: Sodium selenate could be beneficial for ameliorating some symptoms that present in patients with Lafora disease.

KEY WORDS: Lafora bodies, Epilepsy, Oxidative stress, *Epm2b*^{−/−} mouse, Sodium selenate.

Lafora disease (OMIM 254780; ORPHA501) (LD) is a rare autosomal recessive form of progressive myoclonus epilepsy that presents in adolescence with absence, visual, myoclonic, and tonic-clonic seizures or cognitive decline. Myoclonus and seizures respond temporarily to treatment, although they gradually become untreatable. Rapid neurologic deterioration including ataxia, dementia, dysarthria, amaurosis, and respiratory failure leads to death within 5–10 years of disease onset.^{1,2} The principal pathologic feature of LD is the presence of periodic acid–Schiff (PAS)-positive intracellular inclusions of polyglucosans, known as Lafora bodies (LBs), which accumulate in brain, liver,

heart, and other tissues.^{1,3–5} LD is caused by recessive mutations either in the *EPM2A* gene encoding a dual-specificity phosphatase known as laforin (OMIM 607566)^{6–9} or in the *EPM2B* gene encoding malin (OMIM 608072), an E3 ubiquitin ligase.^{10,11} At present, no therapy exists for this disease.

Different mouse models of LD have been generated by disrupting either the *Epm2a*¹² or the *Epm2b* gene.^{13–15} Both *Epm2a*^{−/−} and *Epm2b*^{−/−} mice display many of the neurologic and behavioral abnormalities found in LD patients, including neuronal degeneration and the development of LBs in different organs.^{12,15} Absence of laforin and malin in LD models also produces reactive astrogliosis.^{14,16} Moreover, these models show altered motor activity, impaired motor coordination, and episodic memory deficits.¹⁷ LD mice models present different degrees of spontaneous epileptic activity such as spontaneous single spikes, poly-spikes, and spike-wave and poly spike-wave complexes correlating with myoclonic jerks. Occasionally *Epm2a*^{−/−} mice, but not *Epm2b*^{−/−} mice, also show spontaneous

Accepted November 30, 2016.

*Laboratory of Neurology, IIS-Jiménez Díaz Foundation, UAM, Madrid, Spain; and †Biomedical Research Network Center on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

Address correspondence to Marina P. Sánchez, Laboratory of Neurology, Av Reyes Católicos 2, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM/CIBERER, Madrid 28040, Spain. E-mail: msanchezg@fjd.es

Wiley Periodicals, Inc.

© 2017 International League Against Epilepsy

KEY POINTS

- The *Epm2b*^{-/-} mouse model of Lafora disease displays neuronal degeneration, Lafora bodies, neurologic alterations, and increased seizure susceptibility
- Sodium selenate, a potent antioxidant trace element, diminishes gliosis and neuronal degeneration in malin-deficient mice
- Motor, memory, and anxiety-related alterations improved after sodium selenate treatment
- Sodium selenate reduces seizure sensitivity of *Epm2b*^{-/-} mice to the convulsant agent PTZ
- Treatment with sodium selenate may be beneficial for ameliorating some symptoms of Lafora disease

tonic-clonic seizures as recorded using electroencephalography (EEG) analysis.¹⁷ Both, laforin and malin-deficient mice present an increased sensitivity to the chemoconvulsant pentylenetetrazol,¹⁸ an antagonist of the type A γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptor.¹⁹ The presence of hyperphosphorylated tau aggregates has also been reported in the brain of *Epm2a*^{-/-} mice.^{20,21} At the cellular level, *Epm2a*^{-/-} and *Epm2b*^{-/-} mice present impaired autophagy and defects in the ubiquitin-proteasome system resulting in alterations in the machinery responsible for protein clearance.^{15,22,23} An increase in oxidative stress and an impaired antioxidant response in the brain has been described in both mouse models.²⁴

Selenium is an essential trace element with antioxidant and antiinflammatory effects, and it has been implicated in the production of active thyroid hormone and in psychological functioning.^{25,26} It regulates the expression and activity of selenoenzymes, and thus provides protection from oxidative stress-induced cell damage, which otherwise would lead to neuropsychiatric diseases and disorders like cerebrovascular disease, Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, obsessive compulsive disorders, stroke, and epilepsy.²⁷ Low selenium status has been associated with cognitive decline in patients with AD, and with an increased propensity to seizures in humans and laboratory animals.^{27,28} Sodium selenate regulates the phosphorylation of some key proteins involved in oxidative stress, energy metabolism, and protein degradation in mouse models of different pathologies.²⁹ Moreover, sodium selenate reduces tau hyperphosphorylation by activating PP2A, halts the formation of neurofibrillary tangles, and prevents neurodegeneration, thereby improving memory and motor performance in mouse models of tauopathies.^{30,31} By dephosphorylating tau, sodium selenate also suppresses the epileptic seizures induced by various epileptogenic substances in rodent models,^{32,33} and attenuates brain damage, improving behavioral outcomes in rat models of traumatic brain injury.³⁴ Another

oxidized form of selenium, sodium selenite, induces an anti-convulsant effect in PTZ-induced seizures in mice.²⁷

In order to find a new treatment that could improve the devastating neurologic alterations present in patients with LD, we analyzed the effects of sodium selenate in *Epm2b*^{-/-} mice on motor behavior, memory function, and seizure susceptibility.

METHODS

Animals

Malin-deficient mice were used for our study. *Epm2b*^{-/-} mutant mice were generated by deletion of the single exon encoding malin, as described in Criado et al.¹⁵ Four groups of 12–25 animals were used per condition: wild-type mice; *Epm2b*^{-/-} mice; *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment for 4 weeks; and *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment for 10 weeks.

The mouse colonies were bred at the IIS-Jiménez Díaz Foundation Animal Facility, and were maintained in separate cages, on a 12:12-h light/dark cycle under constant temperature (23°C), and with access to food and water ad libitum. The experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles and the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, and were approved by the IIS-Fundación Jiménez Díaz Ethical Review Board.

Sodium selenate treatment

Treatment with sodium selenate was performed in *Epm2b*^{-/-} mice at 9 months of age. Sodium selenate (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.) was dispensed at a dose of 1.2 mg/100 ml in water ad libitum³¹ during 4 or 10 weeks, and animals were then subjected to the tests detailed below. After 1 month of analysis, five animals from each group of treatment were anesthetized and transcardially perfused with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for histochemical analysis. Brains were recovered from mice at 11 months of age for the group with 4 weeks of treatment, and at 12 months of age for the group with 10 weeks of treatment, and processed for histologic analysis.

Motor coordination and balance

An accelerating rotarod (Panlab/Harvard) was used to test neuromuscular abnormalities and resistance to fatigue. The ability of the mice to remain on the rod was measured according to the time elapsed until they fell (latency time) after 2 days of training.¹⁷

Tail suspension test (TST)

The TST was used to evaluate dyskinesia and abnormal hindlimb clasp response of mice when subjected to tests of vertical suspension from the tail. Each mouse was vertically suspended from the middle of the tail for 30 s and their

responses were scored using a behavioral scale ranging from “0,” when the hindlimbs were completely extended (normal wild-type posture); “1,” when one or both hindlimbs were intermittently extended and bent; and “2,” when both hindlimbs were completely bent and folded into the abdomen. The number of animals falling under each behavioral-scale value was represented as a percentage of the total.

Spontaneous activity

A computerized actimeter (PanLab/Harvard) was used to study the spontaneous motor activity of the mice. The number of times that the animal crossed the infrared light beams located at the actimeter cage was counted for spontaneous surface displacement, and for rearing and stereotyped movements with the Sedacom 1.4 software (Panlab/Harvard) at 15-, 30-, 45-, and 60-min intervals.¹⁷ The arena of the actimeter was divided into two zones—the central and the surrounding area—and the percentage of time spent in the central zone was also quantified (Actitrack 2.7.13 Panlab/Harvard).

Object recognition task (ORT)

We used the ORT to measure episodic memory retention. Briefly, two objects of similar texture, color, and size (Lego toys) were placed in the center of a black wood chamber.¹⁷ The time employed in exploring the two equivalent objects (tA and tB, objects A and B) was measured for each mouse in the sample familiarization phase. The test session was performed 2 h later, and the times (tA and tC) that animal spent exploring two objects, a familiar object (A), and a novel object (C), were recorded. A discrimination index (DI) was calculated as the ratio of the difference between the exploration times of the new object (tC) and the familiar object (tA) with respect to the total (tT) exploration time, and was expressed as the following equation: $DI = tC - tA/tT$.

PTZ treatment

PTZ (Sigma Chemicals) was administered intraperitoneally as a single injection at 30 and 50 mg/kg.³⁵ The percentage of mice showing PTZ-induced myoclonic jerks and generalized seizures was monitored over a period of 45 min. In addition to measuring epileptic activity, PTZ-induced lethality was also analyzed for each drug dose.

Histology and Immunohistochemistry

The animals were anesthetized and perfused transcardially with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde. Brains were removed and embedded in paraffin. Brain blocks were then sectioned in serial arrays of 3- μ m-thick sections and processed for PAS staining, as described previously.³⁶ For immunohistochemistry, slices were rehydrated in graded alcohols, incubated in boiling 0.1 M sodium citrate buffer pH 6.0, and subjected to two cycles of microwave irradiation for 2 min each for antigen retrieval. Sections were incubated with glial fibrillary acidic protein

(GFAP) antibody (Millipore, Temecula, CA, U.S.A.), a neuronal specific marker (NeuN; Millipore) and AT8, an antibody directed against phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) and stained using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). Immunoreactivity was developed with diaminobenzidine and H₂O₂ (DakoCytomation, CA, U.S.A.).

Statistical analysis

Values are given as means \pm standard error of means (SEMs) or percentages. Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) or chi-square test. Statistical significance was considered to be reached at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (Graph-PadPrism2.0) ($n = 12$ –25).

RESULTS

Motor coordination and abnormal gait improvement after treatment with sodium selenate in malin-deficient mice

Malin-deficient mice showed alterations in motor coordination when they were analyzed using a rotarod, displaying a significantly lower mean latency than age-matched controls before falling from the rod¹⁵ (Fig. 1A). Here, in malin mutant mice, we studied the effects of the administration of sodium selenate on their motor coordination. After 4 weeks of treatment, sodium selenate slightly increased the time that *Epm2b*^{−/−} mice stood on the rod, causing a significant increase in this time after 10 weeks of treatment, such that the differences with control mice disappeared (Fig. 1A).

Lack of malin in mice also produced hind-limb clasping and abnormal gait response in the TST¹⁵ (Fig. 1B). Although the 4-week treatment with sodium selenate significantly improved the abnormal postures of mice, a longer treatment with this drug further ameliorated these alterations (Fig. 1B).

Spontaneous locomotor activity alterations and anxiety-related behavior of malin-deficient mice after treatment with sodium selenate

Analysis of accumulated activity, rearing, and stereotyped movements in a computerized actimeter showed the presence of motor alterations in malin-deficient mice¹⁵ (Fig. 2A–C). Here, we also measured the permanence of *Epm2b*^{−/−} mice in the central zone of the arena to analyze exploration behavior (Fig. 2D). We observed that *Epm2b*^{−/−} mice spent a lower percentage of time in the central zone of the arena than in the surrounding areas, indicating anxiety-like behavior (Fig. 2D). After a short, 4-week treatment with sodium selenate, alterations of spontaneous accumulated (Fig. 2A), rearing (Fig. 2B), and stereotyped (Fig. 2C) movements, as well as anxiety-like behavior

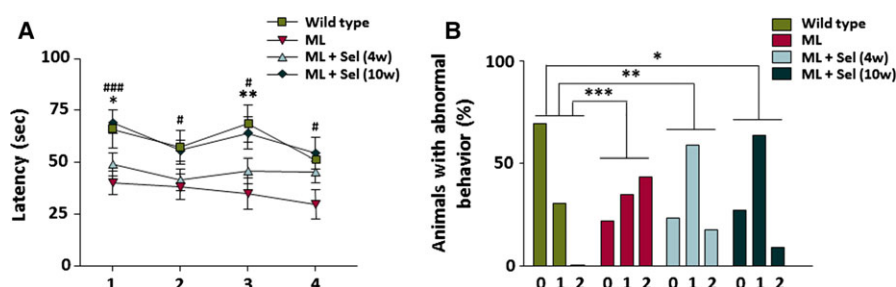


Figure 1.

Analysis of motor coordination and abnormal postures in *Epm2b*^{-/-} mutant mice after treatment with sodium selenate. **(A)** Rotarod-based analysis of motor coordination in controls (*n* = 23) and *Epm2b*^{-/-} mice (*n* = 24), in *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment for 4 weeks (*n* = 22), and in *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment over 10 weeks (*n* = 15) (trials 1–4). The mean latencies (time to fall from the rotarod) were significantly lower for *Epm2b*^{-/-} mice than for controls. Sodium selenate treatment for 4 weeks in *Epm2b*^{-/-} mice slightly increased the latency period, whereas a longer treatment significantly improved performance. Student's *t*-test was performed for statistical evaluation. **(B)** Percentage of animals showing normal posture (0), partially altered (1) or high abnormal (2) stereotypical claspings of the hind limbs upon tail suspension. The frequent hind-limb claspings of *Epm2b*^{-/-} mice improved progressively with sodium selenate treatment (*n* = 23 for wild-type, *n* = 24 for ML, *n* = 20 for ML + Sel [4 weeks], and *n* = 15 for ML + Sel [10 weeks] mouse groups). A chi-square test was performed for statistical analysis. *Indicates *p* < 0.05, **indicates *p* < 0.01, and ***indicates *p* < 0.001 when control mice were compared to *Epm2b*^{-/-} mice; #indicates *p* < 0.05 and ####indicates *p* < 0.001 when *Epm2b*^{-/-} mice were compared to *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment for 10 weeks. ML, malin-deficient mouse; Sel, sodium selenate.

Epilepsia © ILAE

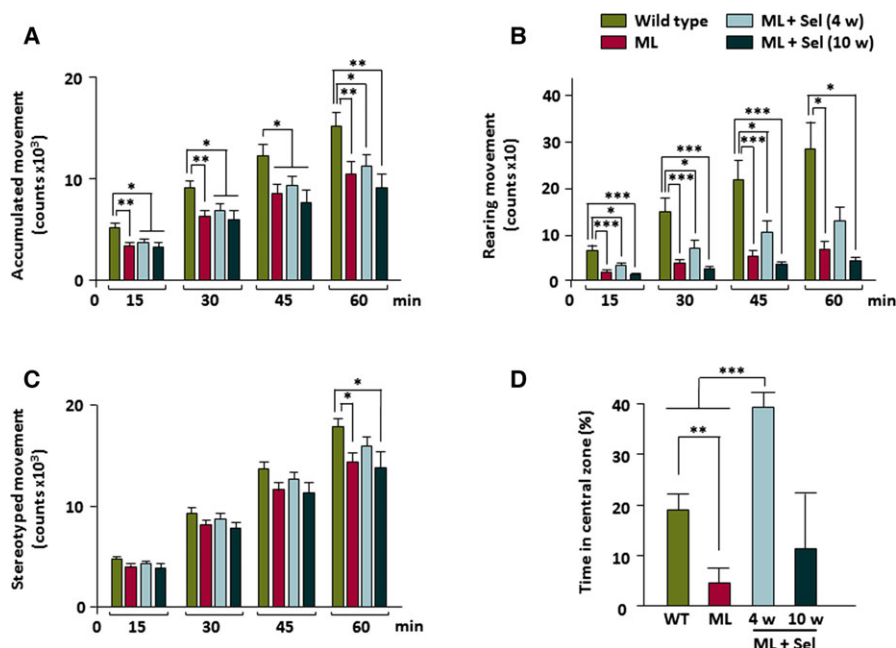


Figure 2.

Motor and mood abnormalities in *Epm2b*^{-/-} mice after sodium selenate treatments. Patterns of accumulated motor activity in controls, *Epm2b*^{-/-} mice, and *Epm2b*^{-/-} mice with selenate treatment for 4 and 10 weeks, measured as **(A)** accumulated, **(B)** rearing, and **(C)** stereotyped movements (*n* = 25 for wild type, *n* = 25 for ML, *n* = 25 for ML + Sel [4 weeks], and *n* = 15 for ML + Sel [10 weeks] mouse groups). Quantitative data represent mean + SEM. Student's *t*-test was performed for statistical evaluation. **(D)** Percentage of time spent by all the four groups in the central zone of arena as a measure of anxiety-like behavior (*n* = 12 for wild type, *n* = 12 for ML, *n* = 12 for ML + Sel [4 weeks], and *n* = 12 for ML + Sel [10 weeks] mouse groups). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA or the chi-square test. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. Note that after 4 weeks of treatment with selenate, motor performance and anxiety improved, whereas a longer treatment eliminated this advance in motor performance and reduced mood improvement. ML, malin-deficient mouse; Sel, sodium selenate.

Epilepsia © ILAE

(Fig. 2D) significantly improved. Unexpectedly, sodium selenate treatment over 10 weeks reversed this effect, and *Epm2b*^{-/-} mice presented similar altered spontaneous activity than untreated malin-deficient mice (Fig. 2A–C). This longer administration of sodium selenate improved exploration and anxiety in malin-deficient mice but to a lesser extent than the shorter treatment (Fig. 2D).

Treatments with sodium selenate improved the episodic memory performance of malin-deficient mice

The effect of sodium selenate on episodic memory in *Epm2b*^{-/-} mice was studied by measuring object recognition learning in the ORT. We previously reported that deletion of the malin gene in *Epm2b*^{-/-} mice produced a deficit in episodic memory¹⁵ (Fig. 3). Herein we show that treatment with selenate for 4 weeks produced a significant improvement in memory performance in malin-deficient mice, while a longer treatment completely abrogated these memory deficits (Fig. 3).

PTZ-induced myoclonus, generalized tonic-clonic seizures, and lethality in mice lacking malin are reduced after treatment with sodium selenate

Following injection of a convulsive dose of PTZ (50 mg/kg), mice displayed intervals of immobility and convulsive

activity, which included hyperactivity, twitching, and hyperextension of the limbs that at times progressed to generalized tonic-clonic seizures, and occasionally to death. We previously recorded the percentages of PTZ-injected *Epm2b*^{-/-} mice that presented muscular jerks, generalized tonic-clonic seizures, and lethality, and reported that lack of malin in *Epm2b*^{-/-} mice increased the sensitivity to PTZ.¹⁸ We show here that sodium selenate treatments decreased the hypersensitivity of malin-deficient mice to PTZ (Fig. 4). Thus, the percentages of *Epm2b*^{-/-} mice showing myoclonic jerks induced by PTZ at subconvulsive (Fig. 4A) and convulsive doses (Fig. 4B) (30 and 50 mg/kg, respectively) were slightly reduced after treatment with sodium selenate. Moreover, treatment with selenate for 4 weeks also decreased the percentage of mice showing PTZ-induced generalized seizures and lethality even under the control levels (Fig. 4C,D), whereas a longer treatment with selenate for 10 weeks completely eliminated generalized seizures and lethality in malin-deficient mice (Fig. 4C, D).

Effects of treatment with sodium selenate on gliosis, neuronal degeneration, and accumulation of PAS-positive LBs

Absence of laforin and malin in LD models also produces gliosis.^{14,16} We estimated the amount of GFAP-positive cells in the dentate gyrus of malin-deficient mice after 4 and 10 weeks of sodium selenate treatment. After 4 weeks of treatment, the number of reactive astrocytes was slightly decreased, whereas selenate treatment for 10 weeks significantly reduced the gliosis produced by the lack of malin (Fig. 5A,D). In addition, we analyzed the number of neuronal nuclei (NeuN) staining and the presence of PAS-positive LBs in equivalent sections of the hippocampus of malin-deficient mice after 4 and 10 weeks of treatment with sodium selenate. Treatment with sodium selenate reduced the neuronal loss observed in *Epm2b*^{-/-} mice, as evaluated by quantifying NeuN staining (Fig. 5B,E). The number of LBs in CA1 of malin null mice did not change significantly after sodium selenate treatments (Fig. 5C,F).

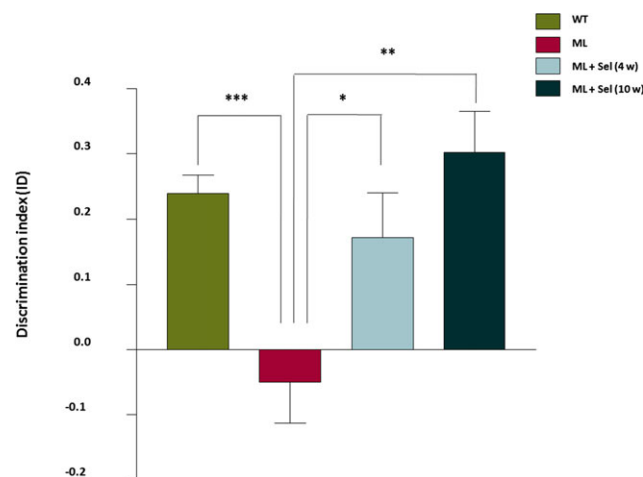


Figure 3.

Assessment of memory performance with the object recognition task. The ORT was performed in control mice ($n = 20$), *Epm2b*^{-/-} mice ($n = 19$), and *Epm2b*^{-/-} mice with sodium selenate treatment for 4 ($n = 20$) and 10 ($n = 12$) weeks. The discrimination index (DI) was calculated as the ratio of the difference between the exploration time of the new (t_C) and the familiar object (t_A), and the total ($t_T = t_A + t_C$) exploration time ($DI = t_C - t_A / t_T$). The DI of *Epm2b*^{-/-} mice was poor, indicating deficits in the retention of episodic memory. Treatments with sodium selenate significantly and gradually improved the memory performance of malin-deficient mice. Values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA was performed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ML, malin-deficient mouse; Sel, sodium selenate.

Epilepsia © ILAE

DISCUSSION

In this study, we used the *Epm2b*^{-/-} malin-deficient mouse model of LD to search for new therapies aimed at ameliorating the neurologic symptoms and epilepsy developing in patients with LD. We report here the effects of sodium selenate, an oxidized form of selenium that presents antioxidant and anticonvulsant properties,^{27,29} on the neurologic alterations produced by the deficiency of the malin protein expression in the *Epm2b*^{-/-} model at 11 months of age. In carrying out this experiment, we found that sodium selenate ameliorates some of these characteristic symptoms. Thus, motor coordination in the rotarod gradually improves after selenate treatment, as was reported previously for

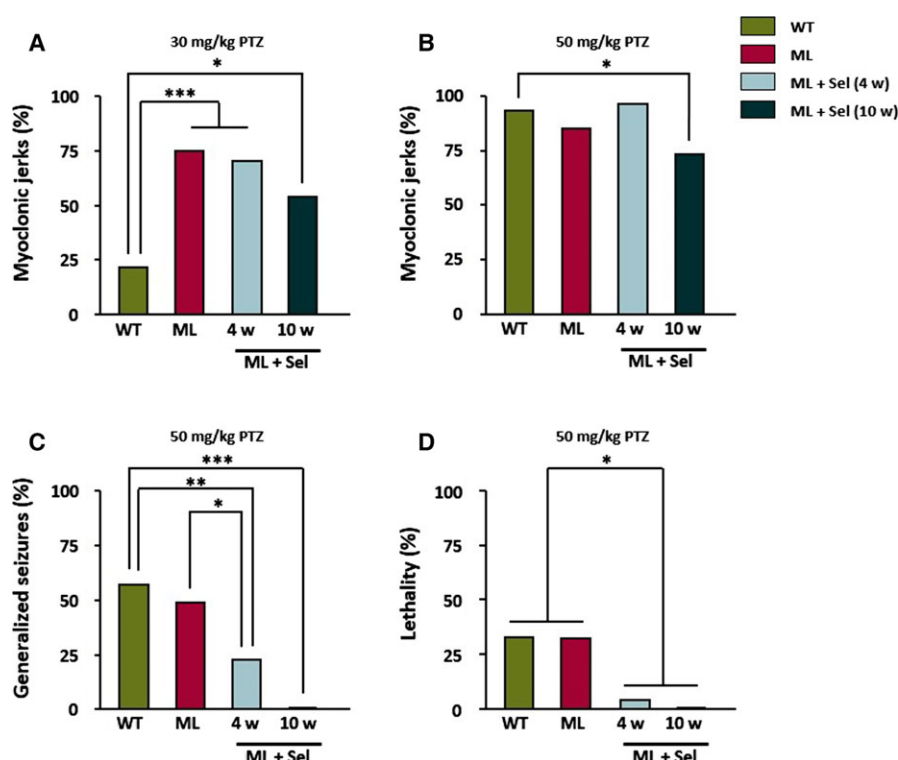


Figure 4.

Sensitivity of *Epm2b*^{-/-} mice to the chemoconvulsant agent PTZ after treatment with sodium selenate. Percentage of *Epm2b*^{-/-} mice with myoclonic jerks after intraperitoneal injection of PTZ at doses of (A) 30 mg/kg and (B) 50 mg/kg significantly decreased after treatment with selenate for 10 weeks. Sodium selenate administration also reduced PTZ-induced (C) generalized seizures, and (D) lethality after 4 week of treatment, whereas at 10 weeks, generalized seizures and lethality disappeared (n = 25 for wild-type, n = 25 for ML, n = 15 for ML + Sel [4 weeks], and n = 12 for ML + Sel [10 weeks] mouse groups). Chi-square was performed for statistical analysis. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. ML, malin-deficient mouse; Sel, sodium selenate.

Epilepsia © ILAE

certain models of tauopathies,^{30,31} rendering *Epm2b*^{-/-} mice indistinguishable from controls after 10 weeks of treatment. Sodium selenate also gradually improved the episodic memory performance of malin null mice, such that after 10 weeks of treatment these deficits disappeared and mutant mice reached the control levels. An improvement in memory performance was also shown previously in mouse models of AD after treatment with sodium selenate.³¹ The abnormal postures and dyskinesia that characterize malin-deficient mice, are also reduced after selenate treatment. Moreover, sodium selenate reduces the sensitivity of *Epm2b*^{-/-} mice to PTZ, diminishing PTZ-induced myoclonus, generalized tonic-clonic seizures, and lethality. This amelioration of the hyperexcitability after treatment with sodium selenate was also described previously for other mouse models of epilepsy.³² A faint improvement in spontaneous motor activity of malin null mice was shown after a short treatment with sodium selenate, whereas a longer treatment gradually worsened this behavior. This effect was also observed when the time spent in the central zone of the arena was measured. Thus, a short selenate treatment

improved the anxiety-like behavior of *Epm2b*^{-/-} mice, although a longer treatment lessened this favorable effect. Astrogliosis and neuronal cell degeneration was also diminished after sodium selenate treatment. The positive effects of sodium selenate on these neurologic alterations of malin-deficient mice may be attributed to the reduction of oxidative stress and to the amelioration of neuronal cell death and gliosis rather than to an action on abnormal glycogen aggregation, since no effects on the amount of LBs were observed after treatment. As noted earlier, sodium selenate was shown to improve neurologic symptoms and epilepsy in different rodent models throughout the activation of PP2A and dephosphorylation of tau, thus preventing the appearance of neurodegenerative processes and seizures.^{30–32} Previous reports on laforin-deficient mice have shown the presence of hyperphosphorylated tau aggregates in different regions of the brain.^{20,21} However, we did not observe hyperphosphorylated tau aggregates in the brain of the malin null mice (data not shown). The lack of tau neuropathology in our LD model indicates that the positive effects of sodium selenate are not due to the activation of PP2A and prevention of tau

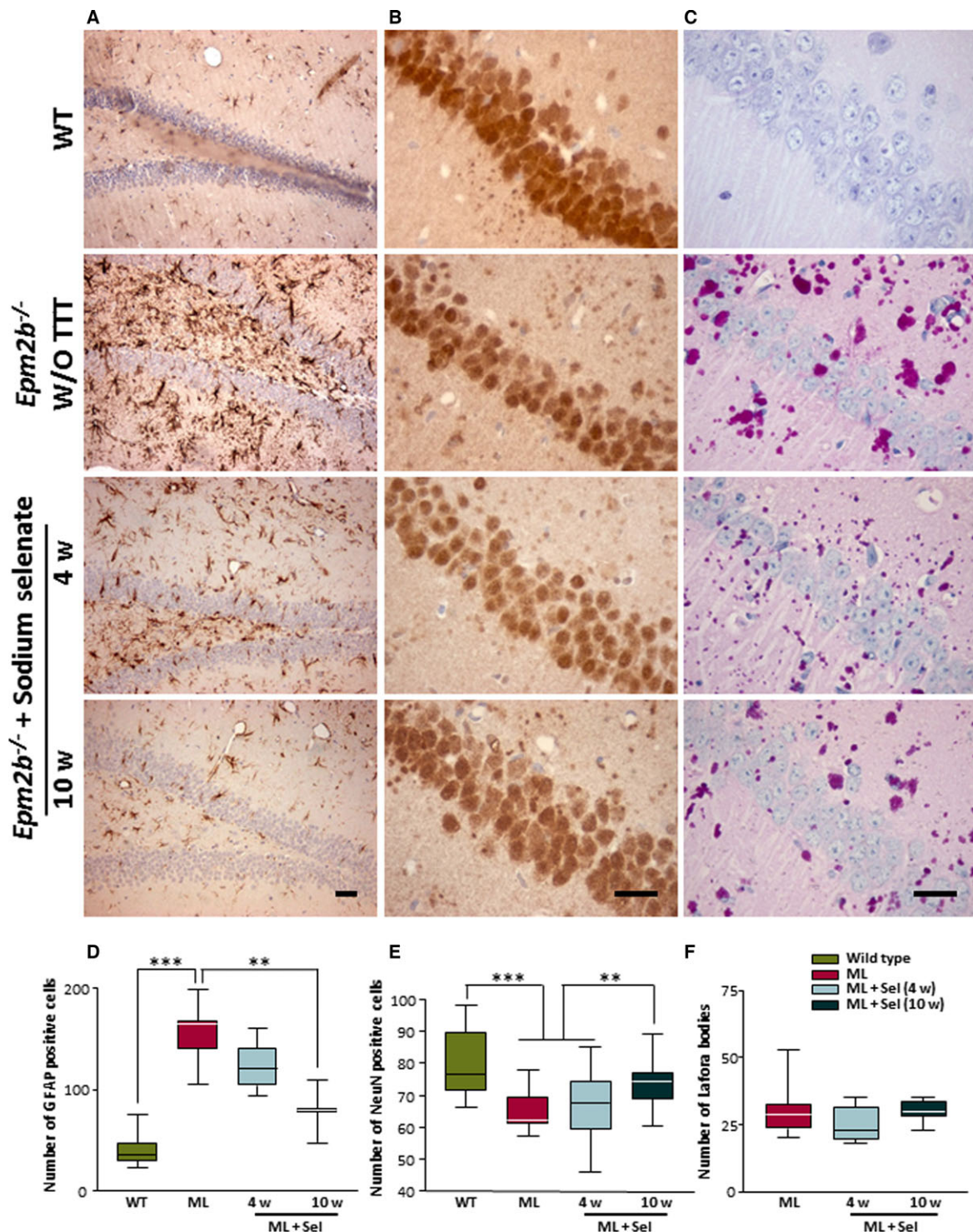


Figure 5.

Neuronal loss, gliosis and Lafora bodies in the hippocampus of *Epm2b*^{-/-} mice after treatment with sodium selenate. Images of representative immunostained sections from dentate gyrus with GFAP (A) and from CA1 with NeuN (B) and PAS staining (C) are shown from wild-type, *Epm2b*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} after selenate treatment for 4 and 10 weeks (scale bars 25 μ m). Graphs show the quantification of GFAP-positive cells (D), NeuN-positive cells (E), and PAS+ inclusions (F) in wild-type, *Epm2b*^{-/-}, and *Epm2b*^{-/-} after sodium selenate treatment for 4 or 10 weeks. Visual blinded quantification was performed in the dentate gyrus and CA1 regions of the hippocampus. Both hemispheres of the brain were quantified in three mice of each group. One-way ANOVA was performed for statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ML, malin-deficient mouse; Sel, sodium selenate.

Epilepsia © ILAE

hyperphosphorylation. Further experiments must be performed to assess the glycogen response to sodium selenate and the mechanisms of action involved in the neurological improvement of our malin-deficient model.

Several treatment-related adverse events have been reported in sodium selenate clinical trials, for example, nausea, diarrhea, fatigue, muscle spasms, alopecia, and nail disorders.³⁷ Long-term exposure to selenium also produced fatigue and other symptoms.³⁸ No treatment-related events were observed during sodium selenate administration to malin-deficient mice, although the gradual decline of the initial improvement in motor and anxiety-related behavior during treatment may be due to side effects of selenium. A novel sodium selenate clinical trial has reported to be safe and well tolerated in patients with AD, at doses up to 30 mg per day for 24 weeks.³⁹

A previous report from Berthier et al. and our group⁴⁰ showed that administration of certain chemicals ameliorated some neurologic alterations found in our *Epm2b*^{-/-} malin-deficient mouse model. Thus, both the chaperone 4-phenylbutyric acid (4-PBA) and the neuroprotector metformin produced beneficial effects on the performance of malin-deficient mice in different functional assays. 4-PBA and metformin are already approved for clinical use in different neurologic pathologies, and selenium is a common ingredient over-the-counter. Therefore, assays with sodium selenate in combination with other substances should be performed in LD animal models, and further tested in clinical trials for their ability to ameliorate some symptoms that present in patients with Lafora disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nuria Cabrero and Maximilià Bautista for technical support, Oliver Shaw for editing assistance, Drs. Alberto Rábano and José Ramón Fortes, Department of Anatomical Pathology and the Animal Facility of the IIS-Jiménez Díaz Foundation. This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria/Carlos III Institute of Health (PI13/00865) from the Spanish Ministry of Health (FEDER), and from the Spanish Ministry of Economy (SAF2014-59594-R to JMS). GSE is supported by a fellowship from the Fundación Conchita Rábago.

DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

REFERENCES

- Berkovic SF, Andermann F, Carpenter S, et al. Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N Engl J Med* 1986;315:296–305.
- Van Heycop Ten Ham MW, De Jager H. Progressive myoclonus epilepsy with Lafora bodies. Clinical-pathological features. *Epilepsia* 1963;4:95–119.
- Lafora GR. The presence of amyloid bodies in the protoplasm of the ganglion cells: a contribution to the study of the amyloid substance in the nervous system. *Bull Gov Hosp Insane* 1911;3:83–92.
- Harriman DG, Millar JH, Stevenson AC. Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain* 1955;78:325–349.
- Carpenter S, Karpai G. Ultrastructural findings in Lafora disease. *Ann Neurol* 1981;10:63–64.
- Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, et al. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 1998;20:171–174.
- Serratosa JM, Gomez-Garre P, Gallardo ME, et al. A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet* 1999;8:345–352.
- Ganesh S, Agarwala KL, Ueda K, et al. Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2251–2261.
- Wang J, Stuckey JA, Wishart MJ, et al. A unique carbohydrate binding domain targets the Lafora disease phosphatase to glycogen. *J Biol Chem* 2002;277:2377–2380.
- Chan EM, Young EJ, Ianzano L, et al. Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 2003;35:125–127.
- Gentry MS, Worby CA, Dixon JE. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8501–8506.
- Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, et al. Targeted disruption of the *Epm2a* gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:1251–1262.
- DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, et al. Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to Lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J Biol Chem* 2010;285:25372–25381.
- Valles-Ortega J, Duran J, Garcia-Rocha M, et al. Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med* 2011;3:667–681.
- Criado O, Aguado C, Gayarre J, et al. Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum Mol Genet* 2012;21:1521–1533.
- Turnbull J, DePaoli-Roach AA, Zhao X, et al. PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease. *PLoS Genet* 2011;7:e1002037.
- Garcia-Cabrero AM, Marinas A, Guerrero R, et al. Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:413–421.
- Garcia-Cabrero AM, Sanchez-Elexpuru G, Serratosa JM, et al. Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylenetetrazole. *Front Neurosci* 2014;8:291.
- Stone WE. Convulsant actions of tetrazole derivatives. *Pharmacology* 1970;3:367–370.
- Machado-Salas J, Avila-Costa MR, Guevara P, et al. Ontogeny of Lafora bodies and neurocytoskeleton changes in Laforin-deficient mice. *Exp Neurol* 2012;236:131–140.
- Puri R, Suzuki T, Yamakawa K, et al. Hyperphosphorylation and aggregation of Tau in laforin-deficient mice, an animal model for Lafora disease. *J Biol Chem* 2009;284:22657–22663.
- Puri R, Suzuki T, Yamakawa K, et al. Dysfunctions in endosomal-lysosomal and autophagy pathways underlie neuropathology in a mouse model for Lafora disease. *Hum Mol Genet* 2012;21:175–184.
- Aguado C, Sarkar S, Korolchuk VI, et al. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet* 2010;19:2867–2876.
- Roma-Mateo C, Aguado C, Garcia-Gimenez JL, et al. Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease. *Mol Neurobiol* 2015;51:932–946.
- Benton D. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutr Neurosci* 2002;5:363–374.
- Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 2005;26:256–267.

27. Rehni AK, Singh TG. Selenium induced anticonvulsant effect: a potential role of prostaglandin E(1) receptor activation linked mechanism. *J Trace Elem Med Biol* 2013;27:31–39.
28. Cardoso BR, Ong TP, Jacob-Filho W, et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *Br J Nutr* 2010;103:803–806.
29. Chen P, Wang L, Wang Y, et al. Phosphoproteomic profiling of selenate-treated Alzheimer's disease model cells. *PLoS One* 2014;9:e113307.
30. Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, et al. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci* 2010;17:1025–1033.
31. van Eersel J, Ke YD, Liu X, et al. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13888–13893.
32. Jones NC, Nguyen T, Corcoran NM, et al. Targeting hyperphosphorylated tau with sodium selenate suppresses seizures in rodent models. *Neurobiol Dis* 2012;45:897–901.
33. Liu SJ, Zheng P, Wright DK, et al. Sodium selenate retards epileptogenesis in acquired epilepsy models reversing changes in protein phosphatase 2A and hyperphosphorylated tau. *Brain* 2016;139:1919–1938.
34. Shultz SR, Wright DK, Zheng P, et al. Sodium selenate reduces hyperphosphorylated tau and improves outcomes after traumatic brain injury. *Brain* 2015;138:1297–1313.
35. Shitak R, Sahai AK, Hota D, et al. Anti-seizure efficacy of nimodipine in pentylenetetrazole and kainic acid combined seizure models in mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006;50:265–272.
36. Mitsuno S, Takahashi M, Gondo T, et al. Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopical characteristics of periodic acid-Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol* 1999;98:31–38.
37. Corcoran NM, Hovens CM, Michael M, et al. Open-label, phase I dose-escalation study of sodium selenate, a novel activator of PP2A, in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;103:462–468.
38. Holness DL, Taraschuk IG, Nethercott JR. Health status of copper refinery workers with specific reference to selenium exposure. *Arch Environ Health* 1989;44:291–297.
39. Malpas CB, Vivash L, Genc S, et al. A phase IIa randomized control trial of VEL015 (Sodium Selenate) in mild-moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2016;54:223–232.
40. Berthier A, Paya M, Garcia-Cabrero AM, et al. Pharmacological interventions to ameliorate neuropathological symptoms in a mouse model of Lafora disease. *Mol Neurobiol* 2016;53:1296–1309.

4-Phenylbutyric acid and metformin decrease sensitivity to pentylenetetrazol-induced seizures in a malin knockout model of Lafora disease

Gentzane Sánchez-Elexpuru^a, José M. Serratosa^a, Pascual Sanz^b and Marina P. Sánchez^a

Lafora disease (LD) is a rare adolescent-onset progressive myoclonic epilepsy caused by loss-of-function mutations either in the *EPM2A* gene encoding laforin or in the *EPM2B* gene encoding malin. Mouse models with deletion in the *Epm2a* or the *Epm2b* gene show intracellular aggregates of polyglucosans (Lafora bodies) and neurological complications that resemble those observed in patients with LD. In the absence of laforin or malin expression, mice also show different degrees of hyperexcitability, as reflected by an enhanced response to the convulsant drug pentylenetetrazol (PTZ). Malin knockout mice treated with 4-phenylbutyric acid (4-PBA) and metformin showed decreased amounts of Lafora bodies and polyubiquitin protein aggregates in the brain, diminished neurodegeneration, and amelioration of some neurological conditions. In this study, we analyzed the action of 4-PBA and metformin treatments on response to PTZ in a malin knockout model of LD. Both treatments decreased seizure susceptibility, bringing about a reduction in both seizure

number and length, and eliminated the mortality induced by PTZ. These results show a neuroprotective role of 4-PBA and metformin and extend the beneficial effects reported in the malin knockout model of LD. *NeuroReport* 28:268–271 Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

NeuroReport 2017, 28:268–271

Video abstract: <http://links.lww.com/WNR/A411>

Keywords: autophagy, epilepsy, Lafora disease, malin knockout mouse, oxidative stress, pentylenetetrazol

^aDepartment of Neuroscience, Laboratory of Neurology, IIS-Jiménez Díaz Foundation, UAM and Biomedical Research Network Center on Rare Diseases (CIBERER), Madrid and ^bDepartment of Nutrient Signalling, Institute of Biomedicine of Valencia, CSIC, and CIBERER, Valencia, Spain

Correspondence to Marina P. Sánchez, PhD, Department of Neuroscience, Laboratory of Neurology, IIS-Jiménez Díaz Foundation, UAM/CIBERER, Av Reyes Católicos 2, Madrid 28040, Spain
Tel: +34 915 497 700; fax: +34 915 497 700; e-mail: msanchezg@fjd.es

Received 29 December 2016 accepted 20 January 2017

Introduction

Progressive myoclonus epilepsy of Lafora or Lafora disease (LD) (OMIM 254780; ORPHA501) is a rare autosomal recessive disease that presents in adolescence with generalized seizures, myoclonic, absence, and visual seizures or cognitive decline. Rapid neurologic deterioration with progressive ataxia, dementia, dysarthria, amaurosis, and respiratory failure leads to death within 5–10 years of disease onset [1]. Patients with LD present Lafora bodies, which are intracellular inclusions of polyglucosan, a long, linear, and poorly branched glycogen. Lafora bodies accumulate in brain, skin, heart, and other tissues. At present, there is no effective treatment for this disease. LD is caused by recessive mutations either in the *EPM2A* gene, which encodes the dual-specificity phosphatase laforin (OMIM 607566) [2–4], or in the *EPM2B* gene, encoding the E3 ubiquitin ligase malin (OMIM 608072) [5,6].

A number of mouse models of LD with targeted deletions of either the *Epm2a* [7] or the *Epm2b* [8–10] genes have been generated. In the absence of laforin or malin expression,

Epm2a^{−/−} and *Epm2b*^{−/−} mice develop Lafora bodies and neurological complications that resemble those found in patients with LD. Thus, both *Epm2a*^{−/−} and *Epm2b*^{−/−} mice manifest with dyskinesia, impaired motor coordination and activity, deficits in episodic memory, and distinct extents of spontaneous epileptic activity [11]. In addition, they also show different degrees of hyperexcitability, as reflected by an enhanced response to the convulsant agent pentylenetetrazol (PTZ) [12], an antagonist of the GABA_A receptor. Laforin and malin knockout mice phenotypically express with impaired macroautophagy and altered ubiquitin–proteasome system, resulting in defects in protein clearance mechanisms [10,13]. Both LD mouse models also show increased oxidative stress and impaired antioxidant response in the brain [14]. In addition to polyglucosan aggregates, Lafora bodies also present ubiquitinated proteins, advanced glycation-end products, chaperones, autophagy components, and proteasome subunits.

A previous report from Sanz's and our group analyzed the effects of treatments with 4-PBA and with metformin in malin mutant mice [15]. 4-PBA is a chemical chaperone that sequesters misfolded and aggregated proteins associated with several human neurodegenerative diseases, whereas metformin promotes autophagy through the

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (www.neuroreport.com).

activation of the AMP-activated protein kinase and acts as a neuroprotective agent in different neurodegenerative diseases [16]. Both treatments decreased the number of Lafora bodies and polyubiquitin protein aggregates in the brain, diminished neurodegeneration, and ameliorated neurological tests in mice lacking the malin protein [15].

To explore the effects of 4-PBA and metformin on the epileptic activity of these mice, we analyzed the susceptibility to PTZ-induced seizures in malin-deficient mice following treatment with these two drugs.

Materials and methods

Animals and treatments

Malin-deficient mice were used for our study. The generation of malin knockout mice was performed by targeted deletion of the single exon encoding malin, as described in Criado *et al.* [10] 4-PBA at 20 mmol/l and metformin at 12 mmol/l (Sigma Chemicals, St Louis, Michigan, USA) were dissolved in drinking water and administered ad-libitum in malin knockout male mice at 3 months of age. 4-PBA and metformin treatments were administered for 2 months and animals were then tested for their sensitivity to PTZ. Four groups of 16 homozygous adult male mice were analyzed per condition: wild-type mice, malin knockout mice, malin knockout mice with 4-PBA treatment, and malin knockout mice with metformin treatment.

The mouse colonies were bred at the IIS-Fundación Jiménez Díaz Animal Facility and were maintained on a 12:12-h light/dark cycle under a constant temperature (23°C), with access to food and water *ad libitum*. The experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles and the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, and were approved by the IIS-Fundación Jiménez Díaz ethical review board.

Pentylentetrazol treatment

PTZ (Sigma Chemicals) was administered intraperitoneally as a single injection at 50 mg/kg. After administration of a convulsive dose of PTZ, mice showed intervals of hyperactivity, twitching, and hyperextension of the limbs that at times progressed to generalized tonic-clonic seizures, and occasionally to death, usually within the first 20 min after injection. The percentage of mice showing PTZ-induced generalized seizures and the lethality were monitored over a period of 45 min. The time interval between drug administration and the development of generalized tonic-clonic seizures (seizure latency) and the length of the seizures were also analyzed. The appearance of additional PTZ-induced seizures for periods of up to 2 h after the administration of PTZ was also evaluated in eight animals per condition, although no concomitant episodes were observed.

Statistical analysis

Generalized seizures and lethality values are given as percentages of animals that respond to PTZ treatment. The χ^2 -test was used to perform the pairwise comparison. Latency time and seizure length values are given as mean \pm SEM and differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Student's *t*-test for pairwise comparison. Statistical significance was considered to be reached at *P* values less than 0.05, 0.01, and 0.001 [(Graph-PadPrism2.0), GraphPad Software, San Diego, California, USA] (*n* = 16/condition).

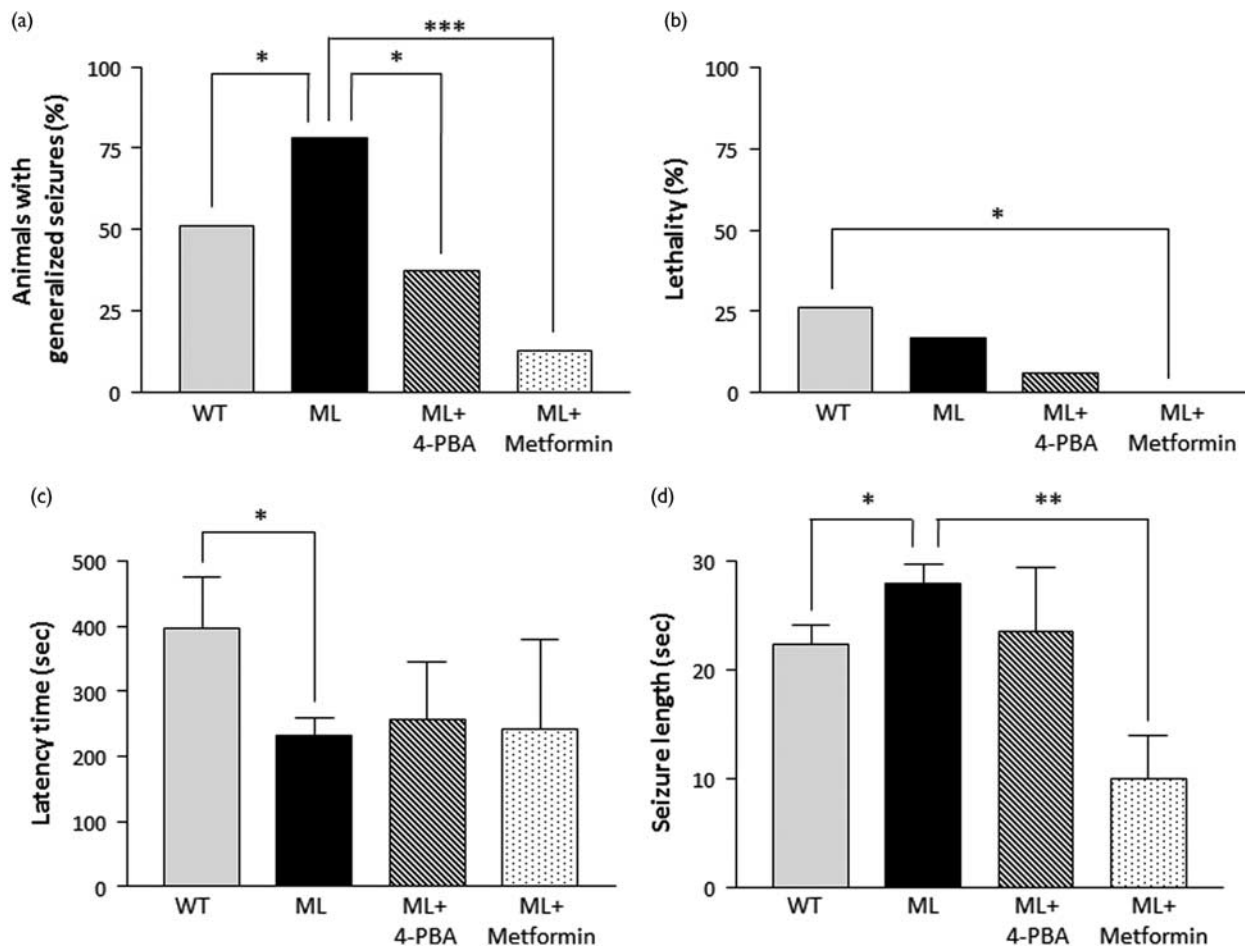
Results

After 2 months of treatment with 4-PBA or metformin, a convulsive dose of PTZ was injected intraperitoneally in wild-type, malin knockout, malin knockout mice after treatment with 4-PBA, and malin knockout mice after treatment with metformin. The percentage of animals showing generalized seizures, mortality, seizure latency, and seizure length were analyzed. Following an injection of PTZ, mice showed freezing and convulsive activity, which later progressed to generalized tonic-clonic seizures, sometimes associated with death. PTZ treatment induced seizures in 50% of wild-type mice, whereas in mice lacking malin, the percentage increased to 78% (*P* < 0.05). Both 4-PBA and metformin treatments decreased the percentage of *Epm2b*^{-/-} mice developing seizures, reaching the wild-type values after 4-PBA treatment and decreasing this percentage below wild-type levels after metformin treatment (Fig. 1a). PTZ-induced mortality had a tendency to be lower in 4-PBA-treated malin knockout mice (6.25%) compared with wild-type mice (25%), although the differences were not statistically significant. After metformin treatment, PTZ-induced mortality decreased to 0% (*P* < 0.05) (Fig. 1b). Seizure latency values were lower for malin mutant mice compared with wild-type mice. Both 4-PBA and metformin treatments increased the latency for PTZ-induced seizure onset in malin knockout mice, eliminating the statistical significance between wild-type and malin knockout mice (Fig. 1c). The length of PTZ-induced seizures in the malin knockout model was significantly increased compared with wild-type mice (*P* < 0.05). After 4-PBA treatment, no significant differences were observed between malin knockout and wild-type mice, whereas seizure lengths were even shorter after metformin treatment (*P* < 0.001) (Fig. 1d). Thus, 4-PBA and metformin decrease PTZ-induced seizures, mortality, and seizure lengths, ameliorating the hyperexcitability detected in mice lacking the malin protein.

Discussion

We have previously described the effects of 4-PBA and metformin treatments in *Epm2b*^{-/-} mice in decreasing the number of Lafora bodies, reducing neurodegeneration and gliosis, and improving motor behavior and

Fig. 1



Sensitivity of *Epm2b*^{-/-} mice to PTZ after treatment with 4-PBA and metformin. (a) 4-PBA and metformin decreased the percentage of mice with generalized seizures after an intraperitoneally PTZ injection. The χ^2 -test yields $\chi^2 = 15.38$ on 3 d.f. with a *P*-value of 0.0015. (b) Reduced mortality induced by PTZ after 4-PBA administration, and lack of PTZ lethal effects after metformin treatment. The χ^2 -test yields $\chi^2 = 7.823$ on 3 d.f. with a *P*-value of 0.0498. (c) After 4-PBA and metformin treatments, the differences between wild-type and *Epm2b*^{-/-} in latency time (with a *P*-value of 0.0431 in Student's *t*-test) are no longer present. (d) Seizure length was lowered by 4-PBA, and significantly by metformin. The one-way ANOVA showed a *P*-value of 0.0294 and an *F*-ratio of 3.483. ANOVA, analysis of variance; ML, malin knockout mice; 4-PBA, 4-phenylbutyric acid; PTZ, pentylenetetrazol; WT, wild-type mice. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

memory [15]. In this study, we tested the effects of 4-PBA and metformin on the increased sensitivity of this model to PTZ. We show that both treatments ameliorate the sensitivity of malin-deficient mice to this epileptogenic agent. The mechanisms involved in the anti-epileptic action of 4-PBA and metformin are unknown, as are the mechanisms involved in the generation of epileptic seizures in LD. Studies addressing how LBs or other biological alterations result in the epilepsy of LD are lacking. Laforin and malin have been involved in the regulation of glycogen metabolism [17], and they have also been implicated in alternative physiological pathways, such as endoplasmic reticulum stress response and protein clearance [10,15]. In our previous report [15], we also described that 4-PBA increased the levels of the chaperone BIP/Grp78, involved in the amelioration of

proteostasis dysfunction, and that metformin induced the activation of the AMP-activated protein kinase complex. However, as we mentioned above, the way in which these abnormalities induce epileptic discharges and seizures is unknown. The positive effects of 4-PBA and metformin on the hypersensitivity of malin-deficient mice to PTZ may be attributed to the reduction of Lafora bodies in GABAergic neurons as a decreased amount of LBs was observed after treatment with 4-PBA and metformin, or could also be a consequence of the amelioration of selective neuronal cell death and gliosis [15].

Thus, treatments with 4-PBA and metformin show further beneficial results in our malin knockout LD mouse model. As these compounds are already approved for clinical practices in different pathologies, we argue that

they could be tested in clinical trials for their potential capacity to improve some symptoms that present in patients with Lafora disease.

Acknowledgements

The authors thank Oliver Shaw for editing assistance and the Animal Facility of the IIS-Jimenez Diaz Foundation. This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria/Carlos III Institute of Health (PI13/00865) from the Spanish Ministry of Health (FEDER), the Spanish Ministry of Economy (SAF2014-59594-R to JMS), and by the Biomedical Research Network Center on Rare Diseases, CIBERER.

This work was supported by grants from the Carlos III Institute of Health (PI13/00865, FEDER), from the Spanish Ministry of Economy (SAF2014-59594-R), and by the Biomedical Research Network Center on Rare Diseases, CIBERER. GSE is supported by a fellowship from the Conchita Rabago Foundation.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- 1 Van Heycop Ten Ham MW, De Jager H. Progressive myoclonus epilepsy with Lafora bodies. Clinical-pathological features. *Epilepsia* 1963; **4** (1–4):95–119.
- 2 Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, *et al.* Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 1998; **20**:171–174.
- 3 Serratos JM, Gomez-Garre P, Gallardo ME, Anta B, de Bernabe DB, Lindhout D, *et al.* A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet* 1999; **8**:345–352.
- 4 Ganesh S, Agarwala KL, Ueda K, Akagi T, Shoda K, Usui T, *et al.* Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 2000; **9**:2251–2261.
- 5 Chan EM, Young EJ, Ianzano L, Munteanu I, Zhao X, Christopoulos CC, *et al.* Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 2003; **35**:125–127.
- 6 Gentry MS, Worby CA, Dixon JE. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:8501–8506.
- 7 Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, Avila MR, Machado-Salas J, Hoshii Y, *et al.* Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet* 2002; **11**:1251–1262.
- 8 DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, Meyer CM, Irimia JM, Roach PJ. Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J Biol Chem* 2010; **285**:25372–25381.
- 9 Valles-Ortega J, Duran J, Garcia-Rocha M, Bosch C, Saez I, Pujadas L, *et al.* Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med* 2011; **3**:667–681.
- 10 Criado O, Aguado C, Gayarre J, Duran-Trio L, Garcia-Cabrero AM, Vernia S, *et al.* Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum Mol Genet* 2012; **21**:1521–1533.
- 11 Garcia-Cabrero AM, Marinas A, Guerrero R, de Cordoba SR, Serratos JM, Sanchez MP. Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; **71**:413–421.
- 12 Garcia-Cabrero AM, Sanchez-Elexpuru G, Serratos JM, Sanchez MP. Enhanced sensitivity of laforin- and malin-deficient mice to the convulsant agent pentylentetrazole. *Front Neurosci* 2014; **8**:291.
- 13 Puri R, Suzuki T, Yamakawa K, Ganesh S. Dysfunctions in endosomal-lysosomal and autophagy pathways underlie neuropathology in a mouse model for Lafora disease. *Hum Mol Genet* 2012; **21**:175–184.
- 14 Roma-Mateo C, Aguado C, Garcia-Gimenez JL, Ibanez-Cabellos JS, Seco-Cervera M, Pallardo FV, *et al.* Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease. *Mol Neurobiol* 2015; **51**:932–946.
- 15 Berthier A, Paya M, Garcia-Cabrero AM, Ballester MI, Heredia M, Serratos JM, *et al.* Pharmacological interventions to ameliorate neuropathological symptoms in a mouse model of Lafora disease. *Mol Neurobiol* 2016; **53**:1296–1309.
- 16 Wiley JC, Meabon JS, Frankowski H, Smith EA, Schecterson LC, Bothwell M, *et al.* Phenylbutyric acid rescues endoplasmic reticulum stress-induced suppression of APP proteolysis and prevents apoptosis in neuronal cells. *PLoS One* 2010; **5**:e9135.
- 17 Tagliabracci VS, Girard JM, Segvich D, Meyer C, Turnbull J, Zhao X, *et al.* Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J Biol Chem* 2008; **283**:33816–33825.

